

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar



Pesquisa de efeitos tóxicos de extrato de *Oenanthe crocata* em organismos aquáticos

Rute Costa Vidal

Dissertação

Mestrado Integrado em Bioengenharia
Biotecnologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Lúcia Guilhermino
Co-orientador: Prof. Dr. Luís Mira Vieira

Instituição: Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e
Ambiental

2014

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Pesquisa de efeitos tóxicos de extrato de *Oenanthe crocata* em organismos aquáticos

Rute Costa Vidal

Mestrado Integrado em Bioengenharia
Biotecnologia Molecular

Orientador: Professora Doutora Lúcia Guilhermino

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto,
Rua de Jorge Viterbo Ferreira nº 228, 4050-313 PORTO, Portugal
Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Laboratório de
Ecotoxicologia e Ecologia, Rua dos Bragas, nº 289 4050-123 Porto, Portugal

Co-orientador: Professor Doutor Luís Mira Vieira

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto
Rua de Jorge Viterbo Ferreira nº 228, 4050-313 PORTO, Portugal

2014

Resumo

Oenanthe crocata é uma planta pertencente à família *Apiaceae* e uma das espécies mais tóxicas da flora europeia. A sua semelhança com plantas comestíveis leva a que muitas vezes seja ingerida equivocadamente, provocando convulsões e eventualmente morte, em animais e humanos. Estes sintomas resultam da depressão do sistema GABAérgico provocado pela oenantotoxina (OETX), o principal composto tóxico de *O. crocata*, o qual se acumula essencialmente na raiz da planta. Por crescer junto a cursos de água doce, situações como chuvas intensas podem expor a raiz e favorecer a transferência de substâncias e, nomeadamente, da toxina para os ecossistemas aquáticos. O objetivo fundamental deste trabalho foi averiguar a toxicidade de extratos de raiz de *O. crocata* em organismos aquáticos, utilizando o microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* como organismo ecotoxicológico modelo. Com esta finalidade, seguiram-se várias etapas: colheita de espécimes de *O. crocata*, extração dos compostos radiculares solúveis e seleção de solvente adequado à sua dissolução, otimização da metodologia de determinação da concentração de extrato nas soluções a testar nos bioensaios, avaliação da degradação dos compostos do extrato e por fim realização de bioensaios de toxicidade aguda com extrato radicular de *O. crocata* para *D. magna*. O organismo modelo mostrou suscetibilidade ao extrato testado, tendo-se determinado o valor de CL₅₀.

Palavras-chave: *Oenanthe crocata*, oenantotoxina, *Daphnia magna*, toxicidade.

Abstract

Being one of the species of *Apiaceae* family, *Oenanthe crocata* has been reported as one of the most toxic plants in Europe. Its misidentification as an edible vegetable is still responsible for many poisoning cases in humans and animals, causing seizures and often death. These symptoms are a result of GABAergic system depression by oenanthotoxin (OETX), the main toxin of *O. crocata*, which concentrates mainly on the plant's root. Growing by the riversides, it is possible that, during heavy precipitation, the root becomes exposed and OETX and some other compounds are incorporated into the aquatic ecosystems. The central aim of this work was to study the toxic potential of *O. crocata* root's extracts on aquatic organisms, using the freshwater microcrustacean *Daphnia magna* as a ecotoxicological model organism. For that purpose, several steps have been taken: harvest of *O. crocata* from growing wild plants, extraction of the soluble root compounds and selection of an adequate solvent for their maintenance, optimization of the methodology for determining the extract concentration in

bioassay test solutions, evaluation of the degradation of extract compounds and conducting of an acute toxicity bioassay with *O. crocata* root extract for *D. magna*. The model organism was susceptible to the test solutions and the LC₅₀ value was determined.

Keywords: *Oenanthe crocata*, oenanthotoxin, *Daphnia magna*, toxicity.

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Professora Doutora Lúcia Guilhermino e Professor Doutor Luís Mira Vieira, pelos seus ensinamentos, apoio e paciência ao longo deste percurso. Prestaram-um uma ajuda preciosa e indispensável à realização deste trabalho.

À Mestre Alexandra Martins, pelo seu companheirismo e por todo o conhecimento partilhado, principalmente na componente experimental, sem o qual a realização deste trabalho não seria possível.

Aos meus colegas de laboratório, Joana Martins, Andreia, Sónia, Pedro, Cristiana, Patrícia, Pedro, Joana Pinto, Daniel e Luís, pelos conselhos e boa disposição.

Aos *Manjericos*, por tornarem os dias mais coloridos e me fazerem lembrar que mesmo em tempos difíceis o mundo continua a girar.

Aos meus amigos, Natasha por ser um exemplo de determinação, Teresa ("Não há longe nem distância"), Abel pela música e compreensão, Levindo pela alegria e disponibilidade.

Ao meu irmão, por me conseguir arrancar um sorriso em qualquer situação.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, por estarem sempre presentes, por serem quem são.

Índice

Lista de figuras e tabelas	11
Lista de abreviaturas e símbolos	13
1. Introdução	15
1.1. <i>Oenanthe crocata</i>	16
1.2. Compostos bioativos de <i>Oenanthe crocata</i> , toxinas e mecanismos de toxicidade	20
1.3. Efeitos de <i>Oenanthe crocata</i> no ambiente	22
1.4. Objetivos do trabalho e estrutura da tese	23
1.5. Espécie modelo: <i>Daphnia magna</i>	25
2. Materiais e métodos	29
2.1. Colheita de <i>Oenanthe crocata</i> e preparação do material biológico	29
2.2. Preparação de extratos secundários de <i>Oenanthe crocata</i> e determinação dos seus espectros de absorção de UV-Vis	30
2.3. Otimização da metodologia para determinação da concentração de extrato durante os bioensaios	30
2.4. Determinação de retas de calibração	31
2.5. Cultura de <i>Chlorella vulgaris</i> e preparação de alimento para <i>Daphnia magna</i>	31
2.6. Cultura de <i>Daphnia magna</i>	33
2.7. Avaliação da toxicidade aguda do extrato de <i>Oenanthe crocata</i> para <i>Daphnia magna</i>	34
2.8. Ensaio de degradação de extrato secundário de <i>Oenanthe crocata</i> em DMSO	35
3. Resultados e discussão	37
3.1. Extratos secundários de <i>Oenanthe crocata</i>	37
3.2. Espectros de extratos secundários de <i>Oenanthe crocata</i> em água ultra pura e ASTM	40
3.3. Determinação de retas de calibração.	42
3.4. Avaliação da toxicidade aguda do extrato de <i>Oenanthe crocata</i> com etanol para <i>Daphnia magna</i> : ensaios	42

preliminares	
3.5. Ensaio de degradação de extrato secundário de <i>Oenanthhe crocata</i> em DMSO	49
3.6. Avaliação da toxicidade aguda do extrato de <i>Oenanthhe crocata</i> com DMSO para <i>Daphnia magna</i>	50
4. Conclusões	57
5. Referências bibliográficas	59
Anexos	63

Lista de figuras e de tabelas

Figura 1 – a) Margem do rio Leça onde *Oenanthe crocata* cresce espontaneamente, Leça do Balio; b) Partes aéreas de *Oenanthe crocata*; c) Raiz de *Oenanthe crocata*.

Figura 2 - Estrutura química de poliacetilenos alifáticos de 17 carbonos presentes na família *Apiaceae*. O falcarinol, a oenantotoxina e os seus derivados *oenantheol* e *oenantheone* são compostos presentes em *Oenanthe crocata*. A cicutoxina encontra-se em *Cicuta virosa* e é um estereoisómero da oenantotoxina.

Figura 3 – *Daphnia magna*, microcrustáceo de ecossistemas dulçaquícolas frequentemente em estudos ecotoxicológicos.

Figura 4 – Cultura de *Chlorella vulgaris*: a) matraz de 10 l onde a cultura foi mantida; b) pormenor do dispositivo de arejamento e de renovação de meio (1 – tubo para saída de ar; 2 – tubo para entrada de ar; 3 – tubo para renovação do meio de cultura).

Figura 5 – Espectros de absorção na região ultravioleta dos extratos secundários de *Oenanthe crocata* preparados em metanol, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e acetona (concentração de extrato primário 0,20 g/l).

Figura 6 - Espectros de absorção na região ultravioleta dos extratos secundários de *Oenanthe crocata* preparados em a) etanol e b) dimetilsulfóxido (DMSO), diluídos em água ultra pura e ASTM.

Figura 7 – Retas de calibração de extrato secundário de *O. crocata* em etanol diluído em a) água ultra pura e b) ASTM, no intervalo de concentrações 2,441 - 39,064 mg/l

Figura 8 - Retas de calibração de extrato secundário de *O. crocata* em DMSO diluído em a) água ultra pura e b) ASTM, no intervalo de concentrações a) 1,221 – 625 mg/l e b) 1,221 e 1250 mg/l.

Figura 9 – Mortalidade em percentagem (%) de *D. magna* durante o ensaio de toxicidade aguda com extrato secundário de *O. crocata* preparado em DMSO. CTR+: controlo com ASTM; SOLV: controlo com solvente (DMSO).

Figura 10 – Gráfico de probite versus logaritmo da concentração de extrato secundário de *Oenanthe crocata* preparado em DMSO ($\log(\text{Concentração de extrato})$) e respetiva equação, relativos às 96 horas de ensaio toxicológico com *Daphnia magna*.

Tabela 1 - Valores médios dos parâmetros físico-químicos (concentração de oxigénio dissolvido, temperatura, pH e condutividade) medidos durante o ensaio de toxicidade aguda do extrato secundário de *Oenanthe crocata* em etanol para *Daphnia magna*, no intervalo de concentrações entre 0,018 e 0,284 mg/l. CTR+: solução controlo com ASTM; SOLV: solução controlo com solvente (etanol) a 0,1 ml/l.

Tabela 2 - Valores médios dos parâmetros físico-químicos (concentração de oxigénio dissolvido, temperatura, pH e condutividade) medidos durante o ensaio de toxicidade aguda do extrato secundário de *Oenanthe crocata* em etanol para *Daphnia magna*, no intervalo de concentrações entre 0,284 e 4,522 mg/l. CTR+: solução controlo com ASTM; SOLV: solução controlo com solvente (etanol) a 1,6 ml/l.

Tabela 3 - Percentagens de mortalidade de *Daphnia magna* exposta a extrato secundário de *Oenanthe crocata* preparado em etanol, durante 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas. CTR+: solução controlo com ASTM; SOLV: solução controlo com solvente (etanol) a 0,1 ml/l.

Tabela 4 - Valores de absorvância média a 312 nm ($A_{\text{média}}$) e respetivo desvio padrão das amostras de solução teste mais concentrada (0,284 mg/l) e menos concentrada (0,018 mg/l), obtidas no

decorrer do ensaio de toxicidade aguda. É também apresentada a percentagem de variação da absorvância média em relação ao seu valor no tempo inicial (% Variação).

Tabela 5 - Percentagens de mortalidade de *Daphnia magna* exposta a extrato secundário de *Oenanthe crocata* preparado em etanol, durante 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas. CTR+: solução controlo com ASTM; SOLV: solução controlo com solvente (etanol) a 1,6 ml/l.

Tabela 6 - Valores de absorvância média a 312 nm ($A_{\text{média}}$) e respetivo desvio padrão das amostras de solução teste mais concentrada (4,544 mg/l) e menos concentrada (0,284 mg/l), obtidas no decorrer do ensaio de toxicidade aguda com extrato secundário em etanol. É também apresentada a percentagem de variação da absorvância média em relação ao seu valor no tempo inicial (% Variação).

Tabela 7 - Valores de absorvância média a 312 nm ($A_{\text{média}}$) e respetivo desvio padrão das amostras de extrato secundário de *O. crocata* preparado com DMSO às condições do ensaio de toxicidade com *D. magna*, a 0,20 g/l. São ainda apresentadas, para cada intervalo de tempo, as percentagens de variação das absorvâncias médias em relação ao tempo inicial (% Variação (0 horas)) e em relação ao intervalo de tempo anterior (% Variação entre intervalos consecutivos). São também apresentados os valores do teste F de Snédecor (F) relativos à análise de variâncias (ANOVA) entre os valores de absorvância do extrato diluído em água e do extrato diluído em ASTM, para cada período de tempo.

Tabela 8 - Valores médios dos parâmetros físico-químicos (concentração de oxigénio dissolvido, temperatura, pH e condutividade) medidos durante o ensaio de toxicidade aguda do extrato secundário de *Oenanthe crocata* em DMSO para *Daphnia magna*. CTR+: solução controlo com ASTM; SOLV: solução controlo com solvente (DMSO) a 0,1 ml/l.

Tabela 9 - Valores de absorvância média a 312 nm ($A_{\text{média}}$ (312 nm)) e respetivo desvio padrão das amostras de soluções teste, obtidas no decorrer do ensaio de toxicidade aguda. É apresentada também a concentração experimental de extrato de *O. crocata* e a suas percentagens de variação em relação às 0 horas (% Variação (0 horas)). Para cada concentração é apresentado valor do teste F de Snédecor (F).

Tabela 10 - Percentagens de mortalidade de *Daphnia magna* exposta a extrato secundário de *Oenanthe crocata* preparado em DMSO, durante 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas. CTR+: solução controlo com ASTM; SOLV: solução controlo com solvente (DMSO) a 0,1 ml/l.

Tabela 11 - Concentração letal a 10% (CL_{10}), concentração letal a 20% (CL_{20}) e concentração letal mediana (CL_{50}), e respetivos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) determinadas para o extrato secundário de *O. crocata* em DMSO.

Lista de abreviaturas e símbolos

μ - Momento dipolar

ASTM – *American Society for Testing and Materials*

CL₁₀ – Concentração calculada da substância teste que provocou uma mortalidade de 10% na população testada nas condições específicas do bioensaio.

CL₂₀ – Concentração calculada da substância teste que provocou uma mortalidade de 20% na população testada nas condições específicas do bioensaio.

CL₅₀ – Concentração letal mediana: concentração calculada da substância teste que provoca uma mortalidade de 50% na população testada nas condições específicas do bioensaio.

D – Debye. Unidade de momento dipolar.

DE₅₀ – Dose efetiva mediana: quantidade calculada da substância teste que provoca uma resposta em 50% da população testada nas condições específicas do bioensaio.

DMSO - Dimetilsulfóxido

EtOH - Etanol

GABA – Ácido gama-aminobutírico

IC 95% - Intervalo de confiança a 95%

MBL – Marine Biological Laboratory

MeOH - Metanol

OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

OETX – Oenantotoxina

REACH – Regulamentação Europeia para os Produtos Químicos

SNC – Sistema Nervoso Central

UV-Vis - Ultravioleta-visível

US-EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

V_m – Potencial de membrana

1. Introdução

As plantas são uma fonte de compostos biologicamente ativos. Estas substâncias, geralmente produzidas como metabolitos secundários, desempenham um importante papel na interação da planta com o meio, sendo particularmente úteis para a planta em situações de defesa e *stress* (Christensen & Brandt 2006). A maior família de plantas floríferas, a família *Apiaceae*, anteriormente designada por *Umbelliferae* é muito rica em compostos bioativos, pelo que algumas espécies são usadas desde tempos remotos na alimentação humana, incluindo a salsa (*Petroselinum crispum*), o coentro (*Coriandrum sativum*) e a cenoura (*Daucus carota*). Alguns dos compostos bioativos das *Apiaceae* possuem propriedades anti-inflamatórias, antifúngicas, antibacterianas ou citotóxicas, o que as torna muito interessantes do ponto de vista farmacológico (Zidorn et al. 2005). No entanto, muitas destas plantas possuem também consideráveis quantidades de toxinas, constituindo um risco de intoxicação para o Homem e outros animais, sobretudo quando ingeridas. Refiram-se, a título de exemplo, a cicuta (*Conium maculatum*) que se tornou célebre pela condenação à morte do filósofo grego Sócrates por ingestão de uma infusão desta planta (Bell 2004; Schep et al. 2009), e espécies do género *Oenanthe*, muito populares devido ao seu uso em tempos antigos em rituais de execução (Appendino & Pollastro 2009) e às intoxicações letais em humanos e animais que ocasionalmente provocam (King et al. 1985; Castroviejo 2003). Na Sardenha pré-romana, as plantas *Oenanthe* eram usadas para intoxicar idosos que perdiam a capacidade de se sustentar e se tornavam um fardo para a sociedade. Exibindo uma contração muscular facial induzida pela planta, eram espancados até à morte ou atirados de um precipício com uma expressão que se assemelhava a um sorriso sinistro, o sorriso sardónico (*risus sardonicus*). (Appendino & Pollastro 2009). Em Portugal, espécies do género *Oenanthe* eram frequentemente empregues na pesca fluvial, embora esta prática não fosse autorizada (Nobre 1896). Os pescadores produziam uma pasta com as raízes da planta que deitavam nas zonas baixas e de águas mais paradas para entorpecer os peixes. As possíveis consequências para a fauna aquática não seriam consideradas pelos pescadores que acreditavam que “embora tóxico este produto (...) desaparecia da água, onde apenas se mantinha enquanto em suspensão” (Fernandes 2013). No género *Oenanthe*

encontram-se das mais tóxicas plantas da flora nativa europeia (Appendino & Pollastro 2009).

1.1. *Oenanthe crocata*

Oenanthe crocata é uma espécie autóctone da zona ocidental da Europa (Grundy & Howarth 1956), incluindo em Portugal, podendo ser facilmente encontrada em zonas húmidas, como margens de rios, ribeiros e lagos (Nobre 1896; Castroviejo 2003) (Figura 1a). É uma planta vivaz e ereta que pode atingir entre os 70 e 150 cm de altura. O caule oco, apresenta sulcos e estrias, e as folhas são triangulares e dentadas, crescendo até 30 cm (Schep et al. 2009; Pinho et al. 2001; Castroviejo 2003). A sua floração, entre maio e junho, revela inflorescências brancas em umbelas terminais (em forma de guarda-chuva), com 10 a 40 raios delgados (Pinho et al. 2001) (Figura 1b). A designação da família a que pertence, *Umbelliferae*, é na realidade atribuída a esta característica (do inglês, *umbrella*) (Schep et al. 2009). Os frutos são cilíndricos com apenas alguns milímetros de comprimento e com uma grande comissura. As raízes são constituídas por numerosos tubérculos, por vezes delgados e compridos, com até 10 cm de comprimento (Castroviejo 2003; Pinho et al. 2001) (Figura 1c). Quase todas as partes da planta são tóxicas, especialmente a raíz cuja ingestão tem provocado intoxicações, por vezes letais, em humanos e animais (Campos & Proença da Cunha 2001; Valente et al. 2013). Estas ocorrências aliadas ao facto da raíz apresentar frequentemente uma parte basal de onde se diferenciam tubérculos num formato que se assemelha vagamente a uma mão humana, esteve provavelmente na origem de um dos seus nomes vulgares em língua inglesa, *dead men's fingers* (Schep et al. 2009). Em Portugal, é vulgarmente conhecida por embude, ou por denominações mais sugestivas como prego-do-diabo ou salsa-dos rios (Pinho et al. 2001; Castroviejo 2003). A semelhança das suas partes aéreas com a salsa (*Petroselinum crispum*) ou o aipo (*Apium graveolens*) e das suas raízes com a cenoura (*Daucus carota*), o ginseng (*Panax quinquefolius*) ou a pastinaca (*Pastinaca sativa*), torna difícil a identificação correta da planta. A maioria das intoxicações descritas em humanos são devidas à preparação de alimentos utilizando a raíz por confusão com espécies comestíveis (Gaillard & Pepin 1999). Por exemplo, no verão de 1974, três jovens habitantes de uma região remota de Gales (Reino Unido) e adeptos de uma dieta baseada na ingestão de

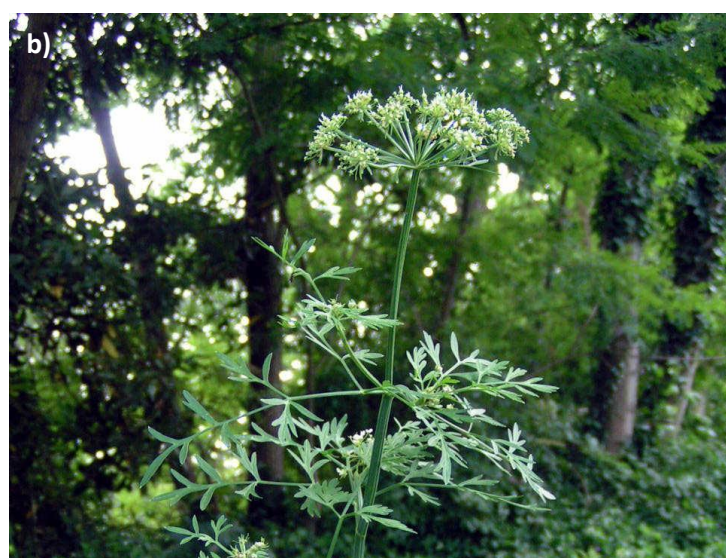


Figura 3 – a) Margem do rio Leça onde *Oenanthe crocata* cresce espontaneamente, Leça do Balio; b) Partes aéreas de *Oenanthe crocata*; c) Raíz de *Oenanthe crocata*.

vegetação natural, terão incluído raízes de *O. crocata* na sua refeição. Os três desenvolveram sintomas de intoxicação alimentar e convulsões, tendo deste episódio resultado uma vítima mortal (King et al. 1985). Em 1978, um jovem químico confundiu as raízes de *O. crocata*, que colheu junto a um ribeiro na Escócia, com pastinacas selvagens, e incluiu-as no seu cozinhado. Pouco tempo após a refeição desenvolveu convulsões e vômitos (King et al. 1985). Outro caso, passado em 1982, relata a ingestão intencional de raízes de *O. crocata* removidas de uma exposição de plantas tóxicas nos Jardins Botânicos de Edimburgo (Escócia), por uma estudante que pretendia experienciar efeitos alucinogénicos. Este incidente culminou na morte da jovem (King et al. 1985). Existem ainda um grande número de intoxicações em crianças (Ball et al. 1987), como por exemplo, o de um menino de 11 anos do sul de França que ingeriu a raíz crua de uma planta posteriormente identificada como *O. crocata*, por pensar que se tratava de uma cenoura selvagem, tendo desenvolvido sonolência e problemas digestivos (Durand et al. 2008).

A concentração de toxinas na planta varia ao longo do ano, dependendo de fatores climáticos e de características do solo (Schep et al. 2009). Os registos que relatam casos de intoxicação em humanos são pouco precisos no que se refere a quantidade de matéria vegetal ingerida, tornando difícil a determinação da dose letal para o Homem. Já se recuperaram 4 mg/l da toxina de *O. crocata* dos conteúdos estomacais de um sobrevivente isento de sequelas (Schep et al. 2009). Contudo, em outro indivíduo, 1 mg de toxina foi suficiente para provocar a sua morte (King et al. 1985), apontando para a possibilidade da dose letal de *O. crocata* em humanos ser bastante reduzida.

Em animais, estão descritas intoxicações em bovinos e equinos, incluindo casos com elevado número de mortes (Cortes 2010; Centre for Aquatic Plant Management 2005; Quality Meat Scotland 2014), já que, ao contrário do que acontece com outras plantas tóxicas, as raízes de *O. crocata* têm um sabor adocicado e um odor agradável (Appendino & Pollastro 2009). As intoxicações ocorrem sobretudo em épocas de escassez de espécies edíveis para os animais (Quality Meat Scotland 2014), em que presença de *O. crocata* nos terrenos de pasto ou suas proximidades leva à ingestão acidental da planta tóxica (Quality Meat Scotland 2014), e após chuvas intensas que provocam arrastamento de solo deixando a descoberto as raízes tóxicas de *O. crocata* (Centre for Aquatic Plant Management 2005), entre outras circunstâncias. Cite-se o exemplo de

uma produção pecuária de bovinos em pastoreio extensivo, localizada em Elvas, na qual se encontraram três animais mortos e outro com incoordenação motora e timpanismo¹ devido à ingestão de *O. crocata*. Este episódio decorreu num dia quente de setembro de 2010, em que o atraso das primeiras chuvas impedia o crescimento de novas ervas e o gado se alimentava do restolho do campo (Cortes 2010). Grande parte dos animais morre em convulsão devido à ausência de tratamento específico para este tipo de intoxicação. Como tal, é importante atuar a nível preventivo, eliminando qualquer vestígio da planta dos terrenos de pasto (Cortes 2010; Quality Meat Scotland 2014). Este controlo do crescimento de *O. crocata* pode ser efetuado mecanicamente, desenterrando, secando e queimando a planta, ou recorrendo a herbicidas (Centre for Aquatic Plant Management 2005).

¹ Distensão da região estomacal em ruminantes.

1.2. Compostos bioativos de *Oenanthe crocata*, toxinas e mecanismos de toxicidade

Apesar de *O. crocata* se ter popularizado pelo seu potencial tóxico, há já muitos anos que as suas flores e folhas são usadas na medicina tradicional, aplicadas ao tratamento de desordens cerebrais e problemas dermatológicos (Valente et al. 2013). O óleo essencial das partes aéreas da planta, excetuando as sementes, são livres de compostos tóxicos, apresentado um perfil de segurança adequado à sua utilização em aplicações terapêuticas. É constituído maioritariamente por monoterpenos hidrocarbonados, entre os quais se destacam o β -ocimeno e o sabineno.

Apresenta atividade antifúngica

contra estirpes de dermatófitos e *Cryptococcus neoformans* (agente infeccioso da meningite fúngica), possui propriedades anti-inflamatórias conferidas essencialmente pelo sabineno, e ainda atividade antioxidante (Valente et al. 2013). O óleo essencial de *O. crocata* poderá, assim, constituir uma importante fonte de compostos bioativos com interesse para as indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica (Valente et al. 2013). O falcarinol, um poliacetileno alifático de 17 carbonos, é outro composto bioativo identificado em *O. crocata* (Dewick 2009). É muito comum na família *Apeaceae*, estando presente em alguns alimentos como a cenoura (*Daucus carota*) e o ginseng (*Panax ginseng*) (Christensen & Brandt 2006; Dewick 2009). A hidrofobicidade do falcarinol e a sua capacidade de formar um carbocatião muito estável com a perda de água, torna-o um composto muito reativo a algumas biomoléculas, o que poderá explicar muitas das suas características bioativas. Entre elas, citam-se as propriedades alergénicas, anti-inflamatórias, antibacterianas e citotóxicas,

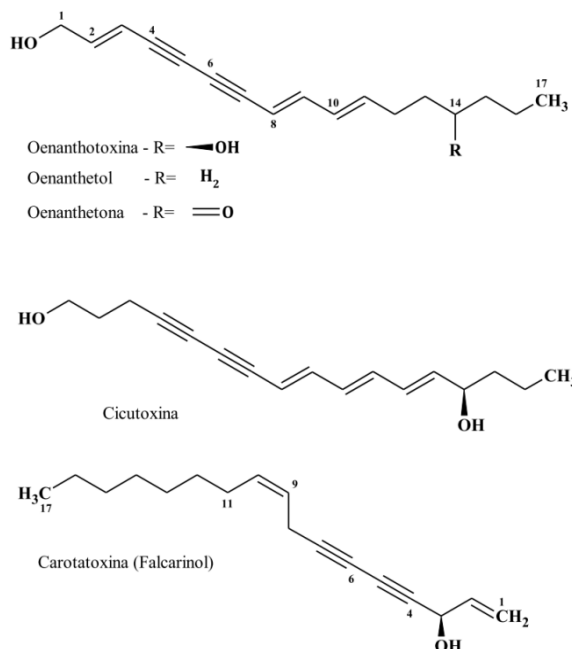


Figura 4 - Estrutura química de poliacetilenos alifáticos de 17 carbonos presentes na família *Apiaceae*. O falcarinol, a oenantotoxina e os seus derivados *oenanthetol* e *oenanthetone* são compostos presentes em *Oenanthe crocata*. A cicutoxina encontra-se em *Cicuta virosa* e é um estereoisómero da oenantotoxina.

algumas das quais com interesse para a indústria farmacêutica (Christensen & Brandt 2006; Kuklev et al. 2013). De referir, a atividade antibacteriana a concentrações não tóxicas para o Homem e a elevada citotoxicidade seletiva contra diversas linhas celulares cancerígenas. A sua citotoxicidade é especialmente efetiva contra células de adenocarcinoma gástrico, ao passo que contra células fibroblásticas humanas normais o efeito é muito menor, exibindo uma DE₅₀ cerca de vinte vezes superior relativamente às células cancerígenas (Christensen & Brandt 2006).

Além do falcarinol (Figura 2), mais de 30 poliacetilenos terão sido isolados de *O. crocata* por Bolhmann e Rode (1968), entre eles, a oenantotoxina (OETX), principal componente tóxico da espécie, e outros três compostos relacionados, a 2,3-dihidro-OETX, o *oenanthetol* e a *oenanthetone* (Kite et al. 2006; Ball et al. 1987). Nesse mesmo estudo, a OETX e a 2,3-dihidro-OETX foram os poliacetilenos isolados em maiores quantidades. A OETX encontra-se mais concentrada nas raízes de *O. crocata* no inverno e início da primavera, estação em que o *oenanthetol* e a *oenanthetone* se tornam mais abundantes. (Ball et al. 1987; King et al. 1985; Gaillard & Pepin 1999). Tanto o *oenanthetol* como a *oenanthetone*, a 14-deoxiOETX e a 14-cetona da 1-deoxiOETX respetivamente, são compostos muito pouco tóxicos (Anet et al. 1953; Kite et al. 2006; King et al. 1985).

A OETX é de um álcool poliacetilénico de 17 carbonos, com um grupo hidroxilo terminal e um outro ligado ao C14 (Schep et al. 2009; Appendino & Pollastro 2009). Trata-se de um isómero da cicutoxina e, como ela, interfere com os recetores GABAérgicos responsáveis pela regulação da excitabilidade neuronal (Gaillard & Pepin 1999; Hill et al. 1953; Schep et al. 2009). A OETX afeta essencialmente os recetores do tipo GABA_A, os mais abundantes do Sistema Nervoso Central (SNC), e que estão presentes em membranas celulares de neurónios e astrócitos (Golan 2012; Schep et al. 2009). Este tipo de recetor é composto por cinco subunidades glicoproteicas organizadas em torno de um canal central, seletivo para iões de cloro. A ligação do ácido γ-aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório do SNC, à região extracelular do recetor, induz a abertura do canal e a geração de um fluxo iónico para o meio intracelular. Consequentemente, as membranas hiperpolarizam, estabilizando as células pós-sinápticas próximo ao seu potencial de membrana em repouso normal ($V_m = -65$ mV). Este fenómeno reduz a

probabilidade de que estímulos excitatórios possam iniciar potenciais de ação e designa-se *shunting* (Golan, 2012). A OETX liga-se de forma não competitiva aos recetores de GABA_A e impede a ocorrência de *shunting* (Appendino et al., 2009; Schep et al., 2009). De acordo com estudos conduzidos por Wyrembek e seus colaboradores, a toxicidade da OETX resulta da ação combinada de uma modelação alostérica dos recetores GABA_A e de um mecanismo de bloqueio de canal aberto (Wyrembek et al. 2010). Mais recentemente, analisando a OETX e outros compostos naturais análogos inibidores do sistema GABAérgico, demonstraram que a sua capacidade de inibição era diretamente proporcional à sua polaridade. Concluíram que estes compostos possivelmente impediriam o fluxo iónico devido à penetração parcial da molécula inibitória no canal. Assim, uma molécula de polaridade superior teria mais facilidade em penetrar o canal e bloqueá-lo. Contudo, os seus efeitos nas respostas nervosas provocados por estes compostos análogos são significativamente menores aos provocados por OETX, o que permanece por explicar (Wyrembek et al. 2012). As propriedades tóxicas dos poliacetilenos como a OETX, estarão associadas a fatores como o tamanho da molécula, a geometria da conjugação pi dentro do grupo polinsaturado e a presença dos grupos hidroxilos (Schep et al. 2009). Além disso, a distância entre os dois grupos hidroxilo desta molécula parece ser particularmente importante para o desencadear do tipo de sintomas convulsivos que lhe são característicos e provavelmente terão responsabilidade no desencadear de um mecanismo de ação específico (Christensen & Brandt 2006).

1.3. Efeitos de *Oenanthe crocata* no ambiente

Oenanthe crocata é uma planta muito abundante no nosso país e na Europa (Fig 4), sendo também mantida em parques biológicos e reservas naturais onde contribui para a manutenção dos ecossistemas e preservação da biodiversidade (Boardman et al. 2013; Saunders 2012; Parque Biológico de Vinhais n.d.). A *Database of Insects and their Food Plants* (DBIF), uma compilação das interações publicadas entre os invertebrados herbívoros da Grã-Bretanha e as suas plantas hospedeiro, documenta diversas espécies para as quais *O. crocata* terá um papel importante na sua sobrevivência. Entre elas, encontram-se espécies de insetos das ordens Diptera (*Elachiptera cornuta*, *Psila rosae* e *Cheilosia impressa*), Coleoptera (*Prasocuris phellandrii*, *Hypera pollux* e *Hypera*

adspersa), Lepidoptera (*Depressaria daucella*, *Depressaria ultimella*, *Agonopterix yeatiana*) e Hemiptera (*Cavariella aegopodii*) (Biological Records Centre 2008). É também polinizada por abelhas como as da espécie *Colletes floralis*, fazendo parte da flora de reservas que acolhem espécies de abelhas e vespas, algumas consideradas raras ou em perigo (*Nomada lathburiana*, *Andrena similis* e *Auplopus carbonarius*), sendo possivelmente polinizada por elas (Bees Wasps & Ants Recording Society 1998; Saunders 2012).

Além do valor ecológico que apresenta, *O. crocata* é uma fonte de compostos bioativos com potencial farmacológico, como monoterpenos e poliacetilenos (secção 1.2.), pelo que é importante preservá-la.

1.4. Objetivos do trabalho e estrutura da tese

Conforme anteriormente referido (secção 1.1.), os habitats preferenciais de *O. crocata* são zonas húmidas, principalmente planícies aluviais e margens de rios, ribeiros, canais, lagos e outros ecossistemas aquáticos dulçaquícolas (Castroviejo 2003; Centre for Aquatic Plant Management 2005). Por esses motivos, espécimes de *O. crocata*, incluindo as suas raízes, podem ser incorporados em ecossistemas aquáticos, sobretudo na sequência de episódios de cheias que levam ao aumento dos caudais, lixiviação de solos e arrastamento das plantas até à água, aumentando o risco de exposição e efeitos tóxicos em organismos aquáticos. De acordo com as previsões do último relatório do IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change 2013), espera-se um aumento da frequência e intensidade de eventos extremos, incluindo cheias, no futuro próximo em várias regiões, o que podem contribuir significativamente para aumentar o risco de entrada de *O. crocata* em ecossistemas aquáticos e de ocorrência de efeitos adversos nas comunidades destes ecossistemas. No entanto, e apesar elevado interesse científico e prático desta questão, os efeitos de *O. crocata* em espécies aquáticas são praticamente desconhecidos. Recentemente, investigaram-se os efeitos de um extrato de *O. crocata* no crescimento populacional da microalga *Chlorella vulgaris*, um organismo representativo dos produtores primários de ecossistemas dulçaquícolas vulgarmente usado em ecotoxicologia. Constatou-se que o extrato de *O. crocata*, entre 0,53 mg/l e 17 mg/l, não foi capaz de inibir o crescimento de *C. vulgaris* durante as 96 horas do ensaio (Pinto 2013). A fim de contribuir para o avanço do conhecimento neste domínio, o objetivo central

da presente tese foi testar a hipótese de que extratos da raiz de *O. crocata* são tóxicos para organismos aquáticos, utilizando o crustáceo cladóceros *Daphnia magna* como modelo. Para se atingir o objetivo central, consideram-se cinco fases, que corresponderam aos objetivos específicos do trabalho: (i) otimização da metodologia para obtenção dos extratos da raiz de *O. crocata* a testar; (ii) otimizar a metodologia para determinação das concentrações de extrato nas soluções a testar nos bioensaios, bem como a degradação da substância de interesse, OETX, durante os ensaios de toxicidade; (iii) aprendizagem dos métodos de cultura da microalga *Chlorella vulgaris* que foi utilizada para alimentar o organismo teste; (iv) aprendizagem dos métodos de cultura de *D. magna* e dos bioensaios para avaliação da toxicidade aguda nesta espécie; e (v) avaliar a toxicidade aguda dos extratos da raiz de *O. crocata* para *D. magna*.

A componente experimental da tese encontra-se dividida em oito secções principais: (i) Colheita e preparação do material biológico de *Oenanthe crocata*, que consistiu num trabalho de campo de recolha do material orgânico vegetal, posterior obtenção do seu extrato primário (metanólico bruto) e determinação do espectro de absorção ultravioleta-visível (UV-Vis) correspondente; (ii) Preparação de extratos secundários de *O. crocata* e respetivos espectros de absorção de UV-Vis, etapa em que se procedeu à dissolução do extrato primário em quatro solventes diferentes, sendo então designados extratos secundários, e se seleccionou os que melhor se adaptavam ao estudo em curso; (iii) Otimização da metodologia para determinação da concentração de extrato durante os bioensaios, avaliando o comportamento dos extratos selecionados no meio de cultura do ensaio; (iv) Determinação de retas de calibração para concentração de extrato *versus* absorvância, para validação das concentrações utilizadas nos bioensaios; (v) Cultura de *Chlorella vulgaris* e preparação de alimento para *D. magna*; (vi) Cultura de *D. magna*; (vii) Ensaio de toxicidade aguda com extrato de *O. crocata* em *D. magna*, em que se efetuaram dois ensaios preliminares com extrato secundário de *O. crocata* em etanol e um ensaio com extrato secundário de *O. crocata* em DMSO, com determinação do valor de CL₅₀ e (viii) Evolução do espectro de extrato secundário de *O. crocata* com DMSO às condições do ensaio toxicológico.

1.5. Espécie modelo: *Daphnia magna*

Daphnia magna (Figura 3) é um crustáceo cladócero de água doce com ampla distribuição na Europa. É um organismo zooplanctônico, alimentando-se sobretudo de microalgas. As suas populações naturais têm funções ecológicas da maior relevância, das quais se destacam (i) a regulação das populações de fitoplâncton de que se alimentam, evitando o sobredeenvolvimento destas com risco de eutrofização; (ii) sendo organismos filtradores, filtram a água contribuindo para a sua transparência determinante para a passagem da luz para zonas mais profundas e a manutenção da sua qualidade; e (iii) servem de alimento a fases cruciais do ciclo de vida de predadores de ordem mais elevada, incluindo espécies de peixes utilizados na alimentação humana (Lampert 2006).



Figura 3 – *Daphnia magna*, microcrustáceo de ecossistemas dulçaquícolas frequentemente em estudos ecotoxicológicos.

D. magna foi talvez o primeiro organismo a ser usado em ensaios de toxicidade com espécies aquáticas, sendo atualmente uma das espécies mais usadas em ecotoxicologia como representativa do nível trófico dos consumidores primários de ecossistemas dulçaquícolas.

Vulgarmente conhecida por pulga de água, deve os seus movimentos saltitantes ao segundo par de antenas. É um microcrustáceo filtrador que atua como consumidor primário da cadeia alimentar aquática. À semelhança dos restantes crustáceos, possui um exosqueleto que é renovado diariamente (Ebert 2005). Apenas durante o desenvolvimento de uma ninhada no interior

da câmara incubadora é que o exosqueleto é mantido até que os ovos eclodam ao terceiro dia de incubação, libertando as *D. magna* juvenis para o meio exterior. A primeira ninhada nasce entre o quinto e décimo dia de desenvolvimento de um ciclo de vida que pode durar mais de 2 meses (20°C) (Ebert 2005). É uma espécie que possui reprodução assexuada e sexuada. Em condições ambientais favoráveis, a reprodução é assexuada e faz-se por partenogénese cíclica. Neste caso, as dáfnias progenitoras geram juvenis geneticamente idênticas a si e, por isso, designados clones. Laboratorialmente, são asseguradas todas as condições para que *D. magna* se reproduza desta forma, suprimindo a variabilidade genética das culturas. Quando as condições são menos favoráveis, *D. magna* produz machos. Estes apenas são produzidos em alturas específicas do ano, no outono e na primavera, e por curtos períodos de tempo. A presença de machos possibilita a reprodução sexuada, aumentando a variabilidade genética da população e consequentemente, a sua capacidade de sobrevivência num ambiente adverso. Os ovos, podem passar por períodos de latência de vários anos, protegidos por um *ephippium*, resistindo a altas temperaturas ou ingestão por outros organismos, eclodindo apenas quando as condições forem favoráveis (Ebert 2005; Lampert 2006).

Diversas são as características que tornam *D. magna* um bom organismo modelo. É um organismo com distribuição mundial, que se reproduz rapidamente (produz ninhadas a cada três dias) originando um grande número de descendentes. A sua reprodução partenogénica permite a manutenção de clones em laboratório durante longo períodos de tempo. Tratando-se de animais de dimensões reduzidas, permitem a manutenção de um grande número de indivíduos em espaços pequenos. São fáceis de manter em cultura e podem ser manipulados manualmente (Guilhermino et al. 2000). O fato de serem animais transparentes pode ser uma aspeto interessante na medida em que permite visualizar órgãos internos e avaliar efeitos morfológicos ou fisiológicos (Lampert 2006).

Os ensaios toxicológicos com *D. magna* são recomendados por protocolos de organizações internacionais, incluindo da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) e da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA), para avaliação da toxicidade de substâncias químicas e são requeridos pela legislação nacional e Europeia, incluindo no âmbito da Regulamentação Europeia para os Produtos Químicos (REACH) e para diversas

finalidades no âmbito da avaliação e gestão de riscos ambientais. Bioensaios com *D. magna* têm sido também vulgarmente utilizados para avaliar a toxicidade de toxinas naturais e extratos de cianobactérias e plantas (Jungmann & Benndorf 1994; Ferreira et al. 2009). Adicionalmente, os ensaios com esta espécie podem ser usados para uma primeira avaliação da toxicidade de agentes químicos para o Homem (Guilhermino et al. 2000; Khangarot & Ray 1988), contribuindo para a redução dos animais vertebrados utilizados para avaliação da segurança e redução do risco de agentes químicos, de acordo com a filosofia dos três Rs em experimentação animal (*Replacement, Reduction and Refinement*). Pelos motivos anteriormente referidos, foi selecionada esta espécie como modelo para este estudo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Colheita de *Oenanthe crocata* e preparação do material biológico

Exemplares selvagens da planta *Oenanthe crocata* foram colhidos no outono de 2012 na margem sul do rio Leça, na planície aluvial junto ao mosteiro de Leça do Balio, em Portugal (cerca de N 41º.21'02.10", W 8º.62'19.82"). Os espécimes recolhidos foram identificados até à espécie (Castroviejo, 2003) e as suas raízes foram separadas e lavadas em água corrente para consumo humano de modo a eliminar resíduos sólidos. O material biológico foi seco ao ar livre durante 15 dias em condições de sombra e protegido de eventual precipitação. Após este período e face à elevada dureza e baixa friabilidade das raízes, estas foram colocadas a -80 °C durante 2 dias.

O material biológico mantido a -80 °C, com uma massa correspondente a 160 g, foi pulverizado por ação mecânica e colocado a macerar em recipiente de vidro contendo metanol, no escuro e à temperatura ambiente, durante 24 h, para que ocorresse a extração dos componentes solúveis. O metanol é um solvente muito utilizado em processos de extração, por ter a capacidade de solubilizar uma grande variedade de compostos (polares e alguns apolares), tendo sido já utilizado para isolar toxinas de *O. crocata* (Kite et al. 2006). O líquido extrator obtido foi decantado, filtrado e concentrado por evaporação do solvente a 55 °C através de destilação a pressão reduzida (banho de aquecimento Büchi B-491, rotavapor Büchi R-210, bomba de vácuo Büchi V-850). O reduzido ponto de ebulição (65°C) do metanol possibilita a sua eliminação a temperaturas relativamente baixas, diminuindo a hipótese de degradação dos compostos orgânicos extraídos. O metanol recuperado foi novamente adicionado ao material biológico pulverizado para nova extração. Este procedimento foi repetido até à exaustão, com reunião das diferentes soluções extrativas que foram sendo concentradas, obtendo-se 58,86 g de extrato bruto metanólico de *O. crocata*, o qual será doravante designado por extrato primário.

2.2. Preparação de extratos secundários de *Oenanthe crocata* e determinação dos seus espectros de absorção de UV-Vis

A partir do extrato primário de *O. crocata* foram preparados extratos secundários em metanol (MeOH), etanol (EtOH), acetona e dimetilsulfóxido (DMSO). Para tal, foram recolhidas amostras de extrato primário para novos recipientes de vidro, as quais foram sujeitas a secagem a pressão reduzida e a 50 °C (pistola de secagem Büchi Glass Oven B-585, bomba de vácuo Büchi V-850) para eliminar vestígios de solvente e água. A secagem decorreu até se obter peso constante das amostras. Seguidamente, adicionou-se cada um dos solventes selecionado até se obter uma solução aparente, tendo-se recorrido a banhos de aquecimento (Büchi B-491) e de ultrassons (ultrasonic cleaner FUNGILAB) sempre que necessário. As soluções assim produzidas serão doravante designadas extratos secundários de *O. crocata*. Os quatro extratos secundários foram diluídos à concentração de 0,2 g/l, de modo a permitir a obtenção dos respetivos espectros de absorção no UV-Vis (espectrofotómetro SpectraMax M2, Molecular Devices), entre os comprimentos de onda 200 e 800 nm. As diluições foram efetuadas com o próprio solvente, à exceção do extrato secundário em DMSO que foi diluído em etanol. No final desta etapa escolheram-se os extratos secundários em etanol e em DMSO para prosseguimento do trabalho, sendo a sua seleção justificada na secção 3.1.

2.3. Otimização da metodologia para determinação da concentração de extrato durante os bioensaios

Pretendeu-se averiguar a interferência do meio de cultura usado em ensaios toxicológicos com *D. magna* na leitura espectral do extrato de *O. crocata*. Para isso, determinaram-se os espectros de absorção UV-Vis de dois extratos secundários previamente selecionados, em etanol e em DMSO, no meio de cultura água dura da *American Society for Testing and Materials* (ASTM, 1980) doravante designado ASTM, e também em água ultra pura, para comparação.

As concentrações de ambos os extratos secundários foram inicialmente igualadas no próprio solvente, antes de serem diluídas em água ultra pura, ASTM, a 0,20 g/l. Foram preparados brancos diluindo cada um dos solventes, etanol e DMSO, em água ultra pura ou ASTM, na mesma concentração que as soluções com extrato de *O. crocata* (70,4 ml/l).

2.4. Determinação de retas de calibração

Para a determinação das retas de calibração que relacionavam a concentração de extrato de *O. crocata* com a absorvância ao comprimento de onda de absorção da OETX (312 nm), prepararam-se, em triplicado, soluções diluídas de cada um dos extratos secundários selecionados (etanol e DMSO), em água ultra pura e ASTM. O extrato secundário em etanol foi inicialmente diluído a uma concentração de 625 mg/l, e o extrato secundário em DMSO, a uma concentração de 10 g/l, tanto para a água ultra pura como para o ASTM. A partir destas soluções iniciais, efetuaram-se diluições sucessivas (1:2) até à concentração de 0,01 mg/l. Paralelamente, prepararam-se os brancos usando os respetivos solventes, etanol e DMSO, na mesma concentração (v/v) que a existente nas diluições com extrato. Por fim, efetuou-se a leitura espectralométrica das soluções ao comprimento de onda de estudo.

Determinaram-se quatro retas de calibração, com a respetiva equação e coeficiente de correlação, correspondentes às diluições em água ultra pura ou em ASTM dos dois extratos secundários, preparados com etanol e com DMSO.

2.5. Cultura de *Chlorella vulgaris* e preparação de alimento para *Daphnia magna*

A alga *C. vulgaris* utilizada como ração para as culturas de *D. magna*, foi obtida a partir de culturas laboratoriais. As culturas de *C. vulgaris* foram mantidas em sala de temperatura e fotoperíodo controlados, a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e com 24 h de luz para maximizar o crescimento das culturas, sendo continuamente arejadas através de um filtro com 0,22 μm de porosidade (Millex[®]-GS, Merck Millipore Ltd.). As culturas foram iniciadas através da inoculação assética de 4 l de meio Marine Biological Laboratory (MBL) (Stein 1973) enriquecido com 0,125 ml/l de complexo vitamínico, com 10 ml de *C. vulgaris*. Este inóculo é recolhido para recipiente estéril ao sétimo dia de crescimento, altura em que a cultura atinge a sua fase de crescimento exponencial, sendo conservado a 4°C durante 1 mês. A partir do sétimo dia, o meio foi renovado de dois em dois dias, de forma a manter a cultura em crescimento exponencial. A renovação do meio consiste na substituição de 2 l de cultura pelo mesmo volume de meio MBL com vitaminas, com recurso à diferença de pressão entre os dois recipientes isolados. O volume de cultura de algas recolhido aquando da renovação do meio foi utilizado para a

preparação de alimento para *D. magna*. Para o efeito, efetuou-se uma separação da alga do meio de cultura por centrifugação (centrífuga Kubota 5400) a 2330 g durante 7 minutos. Rejeitou-se o meio (sobrenadante) e ressuspendeu-se a alga (sedimento) em meio ASTM com vitaminas, determinando a sua concentração por espectrofotometria a 440 nm (espectrofotómetro Spectra Max M2). A relação linear entre absorvância e número de células de *C. vulgaris* foi determinada no Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia do CIIMAR, sendo válida no intervalo de absorvâncias [0,400; 0,800]. Como tal, para efeitos de leitura de absorvância, diluiu-se 1:10 (v/v) a suspensão de alga em ASTM. A suspensão, devidamente rotulada com o valor da leitura, foi armazenada a 4°C por um período máximo de 3 dias, tendo sido usada na alimentação das culturas de *D. magna* durante este período.

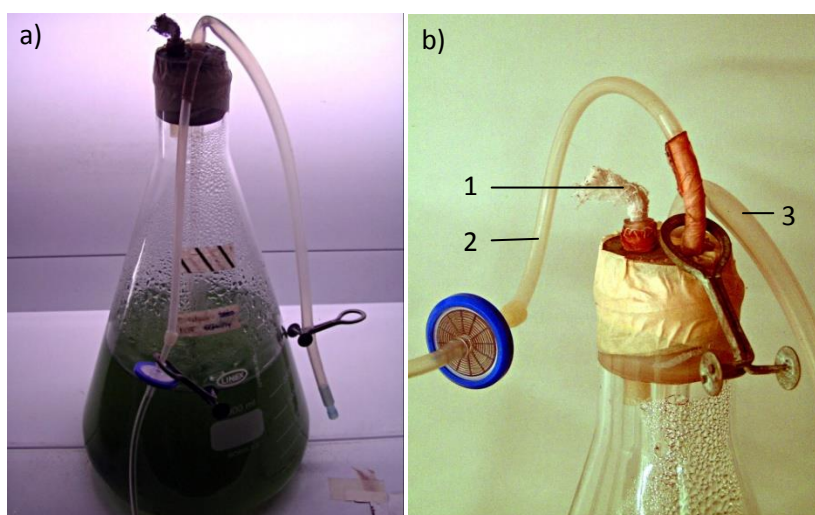


Figura 4 – Cultura de *Chlorella vulgaris*: a) matraz de 10 l onde a cultura foi mantida; b) pormenor do dispositivo de arejamento e de renovação de meio (1 – tubo para saída de ar; 2 – tubo para entrada de ar; 3 – tubo para renovação do meio de cultura).

O MBL é um meio que contém água destilada, solução tampão, macronutrientes e micronutrientes, discriminados no Anexo A.1. As soluções de reserva de tampão, macronutrientes e micronutrientes foram preparadas em água ultra pura e conservadas a 4°C. O meio MBL preparado foi autoclavado (Uniclave 77, AJC) a 120 ± 1 °C durante 60 minutos, assim como todo o material envolvido na inoculação e manutenção da cultura. O material é ainda previamente lavado com ácido nítrico a 10%. As condições de assepsia inerentes aos procedimentos de manipulação da cultura são

garantidas pela limpeza da superfície de trabalho e das luvas com álcool a 70% e pelo trabalho à chama.

2.6. Cultura de *Daphnia magna*

Os exemplares de *D. magna* utilizados nas culturas foram obtidos a partir do clone A desta espécie mantido no Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia do CIIMAR há mais de quinze anos. As culturas individuais foram mantidas em recipientes de 200 ml com um volume de 100 ml de água dura ASTM com adição de um complexo vitamínico (B1, B12 e H) a 0,1 ml/l e de um suplemento orgânico, constituído por um extrato de algas da espécie *Ascophyllum nodosum* a 4 ml/l. Forneceu-se, diariamente, um volume de alimento preparado com *Chlorella vulgaris* correspondente a 3×10^5 células/ml por dáfnia e, a cada dois dias, renovou-se o meio de cultura. As culturas foram mantidas numa sala de condições controladas, com temperatura a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro. Os recipientes foram parcialmente cobertos de modo a permitir trocas gasosas e simultaneamente evitar a entrada de objetos estranhos nos recipientes de cultura. As culturas foram renovadas utilizando juvenis da quinta ninhada. Nas condições experimentais utilizadas, as culturas são mantidas em partenogénese, minorando a variabilidade genética entre os indivíduos e, consequentemente a variabilidade de resultados nos bioensaios.

O meio ASTM foi preparado com água ultra pura (Millipore Millipak®) de condutividade igual a $0,054 \mu\text{S/cm}$ (25°C), NaHCO_3 (Sigma-Aldrich), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich), KCl (Sigma-Aldrich), $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich) e complexo vitamínico (B1, B12 e H) (Sigma-Aldrich).

Para mais detalhes sobre a preparação de complexo vitamínico, suplemento orgânico de *A. Nodosum* e meio de cultura ASTM consultar os Anexos A.2, A.3 e A.4, respetivamente.

2.7. Avaliação da toxicidade aguda do extrato de *Oenanthe crocata* para *Daphnia magna*

Todos os bioensaios foram realizados em sala com temperatura ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (16h luz: 8h escuro) controlados. As restantes condições seguiram genericamente o protocolo nº202 da OCDE (2004), com algumas alterações consoante a seguir descrito. Foi efetuado um primeiro bioensaio para avaliar a toxicidade aguda do extrato secundário de *O. crocata* em etanol (2,840 g/l), preparado conforme indicado na secção 2.2. A partir deste extrato, efetuaram-se diluições sucessivas (1:2, v/v) em etanol, obtendo-se assim 5 soluções de reserva. Pipetou-se um volume de cada uma destas soluções para um balão de vidro contendo ASTM (sem vitaminas e sem extrato de algas), de modo a obter-se sempre uma concentração de 0,1 ml/l de solvente (etanol) no meio de teste. Obtiveram-se deste modo as seguintes concentrações-teste de extrato secundário de *O. crocata* (mg/l): 0,284; 0,142; 0,071; 0,036 e 0,018. De cada uma destas soluções retiraram-se 50 ml para recipientes de vidro de 100 ml de capacidade, tendo sido usados 4 recipientes por tratamento. Utilizaram-se 2 tratamentos controlo: um constituído por ASTM e, o outro, constituído por ASTM contendo etanol (0,1ml/l), a concentração máxima de solvente no meio de teste recomendado no protocolo da OCDE (OECD 2004). Juvenis de *D. magna* com mais de 6h e menos de 24 h de idade, da terceira à quinta ninhada (Martins et al. 2013), selecionados ao acaso, foram distribuídos pelos diferentes tratamentos, em grupos de 5 por recipiente, totalizando assim 20 organismos por tratamento. Os organismos foram expostos durante 96 h, em condições estáticas (i.e. sem renovação de meio) não tendo sido fornecido alimento nem suplemento orgânico. Os recipientes teste foram mantidos parcialmente tapados. O critério de toxicidade foi a mortalidade, reconhecida pela imobilização durante 15 segundos após suave agitação do recipiente de teste, avaliado a cada 24 horas após o início do bioensaio. No início e a cada intervalo de 24h, determinaram-se no meio de teste os seguintes parâmetros: a temperatura, o pH, a condutividade e o oxigénio dissolvido (sonda Multi 340i/SET, WTW). Para avaliar a evolução das concentrações do extrato secundário no meio de teste, foi lida a absorvância a 312 nm no início e a cada 24h, com base no pico de absorvância máxima descrito para a oenantotoxina.

Realizou-se um segundo ensaio de toxicidade aguda com o extrato secundário com etanol, utilizando soluções teste com concentrações superiores

às do primeiro ensaio, enumeradas de seguida (mg/l): 0,284 0,586; 1,136; 2,272 e 4,544. Embora estas soluções possuísem uma concentração de etanol mais elevada do que a concentração máxima de solvente recomendada pela OCDE (2004), foram usadas porque a concentração de extrato secundário preparado em etanol era relativamente reduzida. Contudo, foi feito um tratamento controlo com ASTM e etanol, com a mesma concentração de solvente das soluções teste (1,6 ml/l). À semelhança do primeiro ensaio utilizou-se ainda um tratamento controlo apenas com ASTM.

Foi, ainda, efetuado um ensaio de toxicidade aguda com extrato secundário de *O. crocata* com DMSO, no qual os organismos teste foram sujeitos às seguintes concentrações de substância teste (mg/l): 16,600; 8,300; 4,150; 2,075 e 1,038. Os tratamentos controlo usados foram o ASTM sem vitaminas e ASTM com DMSO à concentração de 0,1 ml/l, a concentração máxima de solvente aconselhada pela OCDE. Neste bioensaio foram usados 15 organismos por tratamento.

No final dos bioensaios e quando aplicável, foram calculados os logaritmos das concentrações de extrato de *O. crocata* e as percentagens de mortalidade, as quais foram convertidas a unidades probite (Finney 1971). As curvas de toxicidade (log das concentrações *versus* unidades probite) foram utilizadas para determinação da concentração letal mediana (CL_{50}), concentração letal a 20% (CL_{20}) e concentração letal a 10% (CL_{10}). A análise estatística foi efetuada com recurso ao programa SPSS versão 20.0.

2.8. Ensaio de degradação de extrato secundário de *Oenanthe crocata* em DMSO

O ensaio de degradação de extrato de *O. crocata* foi realizado utilizando soluções de extrato secundário com DMSO diluído em água ultra pura e em ASTM à concentração de 0,20 g/l. Efetuado nas mesmas condições de luz (16 h luz: 8 h escuro), temperatura ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) e duração (96 horas) dos ensaios toxicológicos com *D. magna*, o ensaio decorreu na ausência de organismos teste. Utilizou-se uma concentração de extrato secundário de *O. crocata* superior à concentração máxima de extrato usada nas soluções teste do ensaio de toxicidade aguda com *D. magna* (16,6 mg/l), por permitir uma melhor leitura dos valores de absorvância. Dado as concentrações usadas nos ensaios

toxicológicos serem relativamente baixas, este ensaio poderia, ainda, superar possíveis problemas na leitura dos valores de absorvância a 312 nm durante o ensaio de toxicidade com *D. magna* e constituir um indicador do comportamento do extrato nas soluções teste ao longo de 96 horas.

Para o ensaio de degradação, diluiu-se o extrato secundário de *O. crocata* em DMSO em ultra pura e em ASTM (sem vitaminas e sem suplemento orgânico) a 0,20 g/L, utilizando seis réplicas para cada solução. Os valores de absorvância a 312 nm foram determinados para as 0h, 4h, 8h, 12h, 24 h, 48h, 72h e 96h.

A partir dos resultados obtidos determinaram-se os valores de absorvância média com o respetivo desvio padrão e ainda a sua percentagem de variação em relação ao valor inicial (0 horas) (Equação 1) e em relação ao intervalo anterior (entre intervalos consecutivos) (Equação 2).

$$\% \text{ Variação (0 horas)} = \frac{A \text{ média}(x) - A \text{ média (0h)}}{A \text{ média (0h)}} \times 100\% \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\% \text{ Variação (entre intervalos consecutivos)} = \frac{A \text{ média}(x_b) - A \text{ média (} x_a \text{)}}{A \text{ média (} x_a \text{)}} \times 100\% \quad (\text{Eq. 2})$$

$$x = 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96$$

$$x_a < x_b$$

Avaliou-se a variância dos resultados obtidos por ANOVA ($P < 0,05$), testando previamente a normalidade e homogeneidade. A análise estatística foi efetuada no programa SPSS versão 20.0.

3. Resultados e Discussão

3.1. Extratos secundários de *Oenanthe crocata*

As concentrações dos extratos secundários, expressas em função do extrato primário (obtido conforme descrito na secção 2.2.), foram as seguintes: 2,970 g/l em metanol; 2,840 g/l em etanol; 3,123 g/l em acetona e 166,000 g/ em DMSO. Estes resultados indicam que o DMSO permite obter um extrato secundário mais concentrado do que os restantes, potencialmente permitindo uma maior rentabilização do material biológico. A capacidade de solubilização dos componentes do extrato dos restantes solventes testados parece ser semelhante.

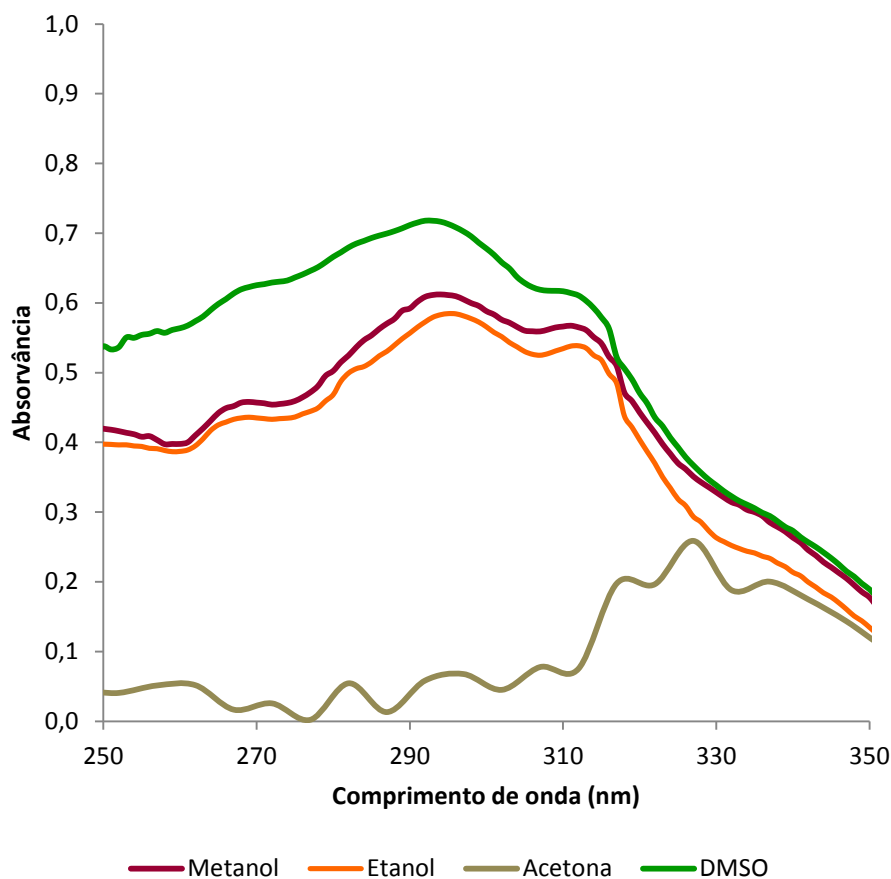


Figura 5 – Espectros de absorção na região ultravioleta dos extratos secundários de *Oenanthe crocata* preparados em metanol, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e acetona (concentração de extrato primário 0,20 g/l).

Verificou-se que os extratos secundários apenas apresentavam bandas de absorção na região do UV, pelo que apenas esta região é apresentada na Figura 5. Todos os extratos apresentam maior absorvância entre os 250 e 350 nm, sendo que os espectros de absorção dos extratos em metanol e etanol são

muito semelhantes. O facto de ambos os solventes serem álcoois alifáticos de cadeia curta com momentos dipolares (μ) aproximados ($\mu_{\text{metanol}} = 1,70$ D e $\mu_{\text{etanol}} = 1,69$ D) faz com que a sua interação com os compostos solúveis do extrato não seja muito diferente. O extrato secundário preparado com DMSO apresenta um espectro parecido com os obtidos com os extratos secundários em etanol e metanol. Ao contrário dos restantes extratos secundários, este não foi dissolvido no próprio solvente mas em etanol, pois o DMSO, por possuir um grupo sulfóxido, apresenta um espectro de UV-vis em que se verifica a absorção da radiação eletromagnética entre os 200 e os 330 nm. Assim, para ultrapassar este problema o extrato secundário em DMSO foi diluído em etanol e foi traçado o respetivo espectro que se observa na Figura 5. O DMSO é um solvente polar aprótico, capaz de estabelecer interações tanto com compostos polares (interações dipólo-dipólo e ligações de hidrogénio) como com compostos apolares (interações de van der Waals). Esta característica deve-se à sua estrutura composta pelo grupo sulfóxido já referido (polar) e por dois grupos metilo (apolares) e é responsável pela sua capacidade de solubilizar uma grande diversidade de compostos (Rammler & Zaffaroni 1967; Barbosa et al. 2003). O espectro secundário em acetona deu origem a um espectro muito distinto dos anteriores. Também este solvente absorve radiação eletromagnética entre os 200 e os 330 nm. A acetona é, à semelhança do DMSO, um solvente aprótico, mas possuindo um grupo carbonilo em substituição do grupo sulfóxido. O comportamento da acetona enquanto solvente, difere do comportamento do DMSO na medida em que o grupo carbonilo, além de ser menos polar do que o grupo sulfóxido, é capaz de estabelecer apenas duas ligações de hidrogénio, ao passo que o DMSO pode estabelecer até três ligações de hidrogénio.

O espectro de absorção do extrato secundário em metanol da Figura 5 exhibe picos aos 268, 294 e 312 nm. Este apresenta semelhanças com o espectro de absorção do extrato metanólico de raízes de *O. crocata* recolhidas no Reino Unido, no período de outono, onde são perceptíveis os picos a cerca de 250, 270, 295, 315 e 335 nm (King et al. 1985). O espectro de absorção de OETX isolada a partir de raízes de exemplares recolhidos no mesmo local, apresenta picos de absorção a comprimentos de onda idênticos, nomeadamente aos 253, 268, 297, 315 e 338 nm (King et al. 1985). Num estudo conduzido por Anet e seus colaboradores (1953), com OETX isolada de raízes de *O. crocata* colhidas em dezembro, foi determinado um espectro de absorção de OETX em metanol

muito semelhante, com picos aos 252, 267, 296, 315,5 e 337,5 nm. O pico do espectro de absorção obtido por espectrofotometria UV-Vis a 315 nm foi usado anteriormente para determinar a concentração de OETX isolada e em extratos metanólicos da planta. Com base neste pico de absorção, foi calculado que um extrato metanólico preparado a partir de raízes de *O. crocata* colhidas durante o inverno continha o equivalente a 0,06% de OETX (King et al. 1985). No entanto, como a concentração de OETX na planta varia ao longo do ano, com as condições climáticas e do solo, este valor não pode ser extrapolado para o presente estudo (Anet et al. 1953; King et al. 1985).

O espectro de absorção do extrato secundário preparado com etanol apresenta picos aos 268, 295 e 313 nm e o extrato secundário com DMSO aos 276, 295 e 312 nm. Os valores dos picos de absorção obtidos com estes três extratos secundários – em metanol, etanol e DMSO – são coerentes e incluem um comprimento de onda (312 ou 313 nm) muito próximo ao referenciado na literatura para determinação da concentração de OETX em metanol (315 nm) (King et al., 1985). Sendo o extrato de *O. crocata* uma mistura complexa de compostos, o seu espectro de absorção UV-Vis resultará da combinação das absorções dos seus componentes. Deste modo, neste trabalho, decidiu-se determinar as concentrações de extrato com base nos valores de absorvância ao comprimento de onda da OETX. Note-se que a absorção a este comprimento de onda não é exclusiva da OETX, pelo que não é possível conhecer a concentração da toxina através da absorvância da solução.

Selecionou-se, de entre os extratos secundários analisados, os que seriam mais adequados ao prosseguimento do trabalho. O extrato preparado com acetona foi excluído, por apresentar um espectro de absorção muito distinto do descrito na literatura e, como tal, não permitir a identificação do pico de absorção referente à OETX. Os extratos com metanol e etanol foram aqueles que apresentaram picos mais bem definidos ao comprimento de onda de absorção da OETX, 312/313 nm e, portanto, os mais indicados para o trabalho a realizar. Uma vez que um dos principais objetivos deste estudo foi a avaliação da toxicidade aguda do extrato de *O. crocata* para *D. magna*, foi também considerada a toxicidade dos dois solventes para o organismo modelo. Ambos os solventes estão aprovados pela OCDE (2000) para utilização em bioensaios toxicológicos com *D. magna*. Contudo, o valor de CL₅₀(48h) do metanol (3,289 mg/L (Guilhermino et al., 2000)) é inferior ao valor CL₅₀(48h) do etanol (5,680 mg/l (Guilhermino et al., 2000)). Assim, selecionou-se o extrato preparado com

o solvente menos tóxico para *D. magna* e, conseqüentemente, com menor probabilidade de interferir com os resultados dos bioensaios, o extrato secundário em etanol.

Após a realização dos bioensaios toxicológicos com *D. magna*, constatou-se a necessidade de utilizar um extrato mais concentrado e, como tal, efetuou-se uma nova seleção de extrato secundário de *O. crocata*. O extrato secundário em metanol não foi considerado como alternativa por possuir uma concentração muito aproximada à do extrato secundário em etanol. Por sua vez, o extrato secundário em DMSO possuía uma concentração significativamente mais elevada, quase 60 vezes superior, tendo sido o extrato secundário selecionado. O DMSO é um composto pouco tóxico para *D. magna*, apresentando um valor de CL₅₀(48h) de 24,6 g/L (Barbosa et al. 2003) e por isso pode ser usado em bioensaios toxicológicos com este organismo.

3.2. Espectros de extratos secundários de *Oenanthë crocata* em água ultra pura e ASTM

A OETX é insolúvel em água e, portanto, foi necessário recorrer a solventes orgânicos para possibilitar o estudo de extratos de *O. crocata* potencialmente tóxicos em meio aquoso. Os solventes orgânicos selecionados foram eficientes na produção de soluções aquosas de extrato de *O. crocata*. A diluição dos extratos secundários em água ultra pura e ASTM, tinha por objetivo investigar alterações relativamente aos espectros UV-Vis previamente determinados e confirmar o comprimento de onda correspondente ao pico de absorção da OETX nestes meios.

Na Figura 6 observam-se os espectros de absorção do a) extrato secundário em etanol e do b) extrato secundário em DMSO, diluídos nos dois meios aquosos. Em ambos os casos se verifica que os espectros de absorção resultantes da diluição em água e da diluição em ASTM são praticamente sobreponíveis, por isso, água e ASTM influenciam de forma idêntica a radiação absorvida. Assim, presume-se que os compostos químicos do meio de cultura ASTM não alterem significativamente a leitura espectrofotométrica destes extratos de *O. crocata*. Os espectros obtidos (Figura 6) são parecidos aos determinados anteriormente para as diluições em solvente orgânico (Figura 5), contudo, observa-se alguma perda de definição dos picos de absorção dos

extratos secundários de *O. crocata*. No caso do extrato em etanol (Figura 6 a), os picos de absorção diferem ligeiramente dos previamente obtidos e registam-se aos comprimentos de onda 296 e 312 nm (ponto de inflexão), para ambas as diluições. Em relação aos espectros das diluições aquosas do extrato secundário em DMSO, regista-se um pico de absorvância aos 296 nm. O espectro resultante da diluição etanólica do extrato secundário com DMSO (Figura 5) é quase sobreponível com os obtidos para as diluições aquosas, mas proporciona uma maior definição dos picos de absorção. Apresenta um pico também aos 296 nm e outro aos 312 nm. Dado a similaridade entre os espectros das diluições aquosas e o espectro da diluição etanólica, é muito provável que este comprimento de onda, 312 nm, seja também o principal comprimento de onda de absorção da OETX nas diluições aquosas.

Deste modo, definiu-se os 312 nm como comprimento de onda de estudo para ambos os extratos analisados, a ser utilizado nos ensaios toxicológicos com *D. magna*.

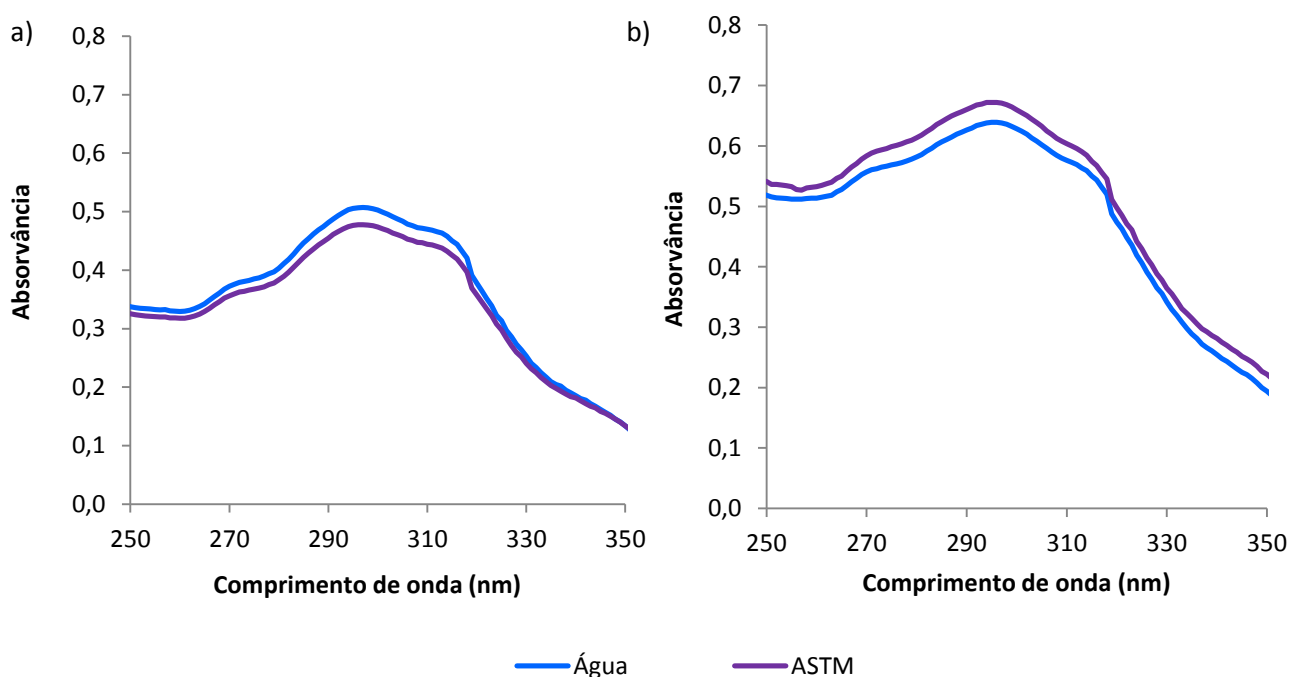


Figura 6 - Espectros de absorção na região ultravioleta dos extratos secundários de *Oenanthe crocata* preparados em a) etanol e b) dimetilsulfóxido (DMSO), diluídos em água ultra pura e ASTM.

3.3. Determinação de retas de calibração

As retas de calibração e respectivos coeficientes de correlação, foram determinados com o intuito de calcular as concentrações experimentais de extrato bruto seco nas soluções teste dos ensaios de toxicidade com *D. magna*. As retas de calibração foram determinadas em água ultra pura e ASTM para os extratos secundários em etanol e em DMSO.

Para o extrato secundário com etanol, determinaram-se as retas de regressão linear da Figura 7 que relacionam a concentração de extrato (mg/l) com a absorvância a 312 nm, válidas entre as concentrações 2,441 e 39,064 mg/l, tanto para a diluição do extrato secundário em água como em ASTM. A equação da reta de calibração obtida para a diluição em água é dada pela expressão analítica $y = 461,2925 x + 1,5409$ ($r^2 = 0,9938$) e a correspondente à diluição em ASTM é descrita por $y = 403,2730 x + 2,5654$ ($r^2 = 0,9814$). A concentrações inferiores a 2,441 mg/l não se verificou uma corelação linear entre as variáveis.

As retas de calibração relativas ao extrato secundário com DMSO estão representadas na Figura 8. Para a diluição em água, a correlação linear entre a concentração de extrato (mg/l) e a absorvância a 312 nm, é descrita pela expressão $y = 397,82 x + 1,355$ ($r^2 = 0,9999$) e válida entre as concentrações 1,221 e 625 mg/l. A reta de regressão linear correspondente à diluição do extrato secundário em ASTM é traduzida pela equação expressão $y = 425,97 x + 0,9336$ ($r^2 = 0,9997$) e a sua validade estabelecida entre 1,221 e 1250 mg/l. A concentrações inferiores a 1,221 mg/l não se verificou uma corelação linear entre as variáveis o que, tal como no caso anterior, estará relacionado com a aproximação do limite de deteção do aparelho.

3.4. Avaliação da toxicidade aguda do extrato de *Oenanthe crocata* com etanol para *Daphnia magna*: ensaios preliminares

O primeiro ensaio de toxicidade aguda com extrato secundário de *O. crocata* em *D. magna* foi realizado com extrato secundário em etanol, no intervalo de concentrações entre 0,018 e 0,284 mg/l. Os valores médios dos parâmetros físico-químicos (concentração de oxigénio dissolvido, temperatura, pH e condutividade) medidos, apresentam-se discriminados na Tabela 1.

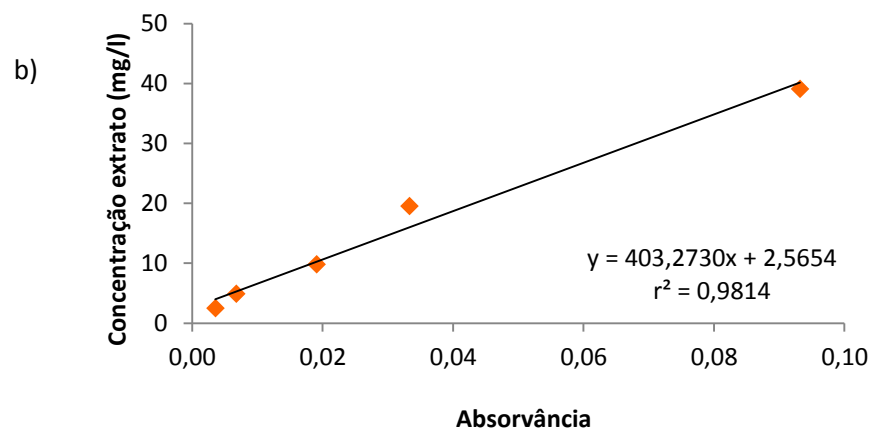
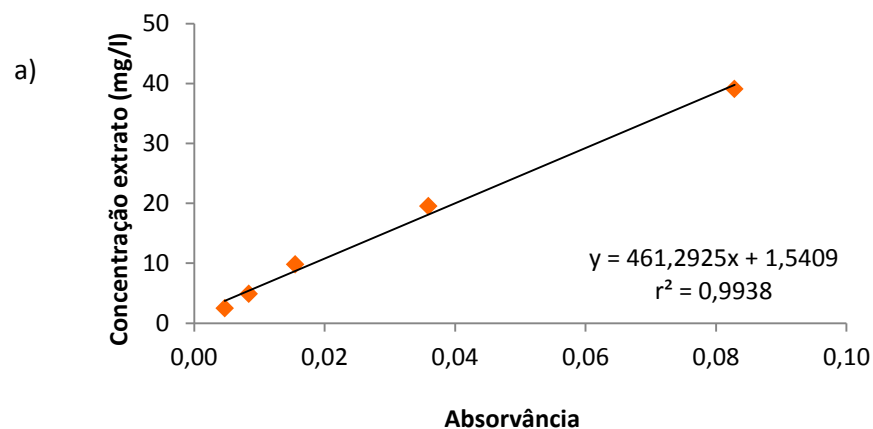


Figura 7 – Retas de calibração de extrato secundário de *O. crocata* em etanol diluído em a) água ultra pura e b) ASTM , no intervalo de concentrações 2,441 - 39,064 mg/l.

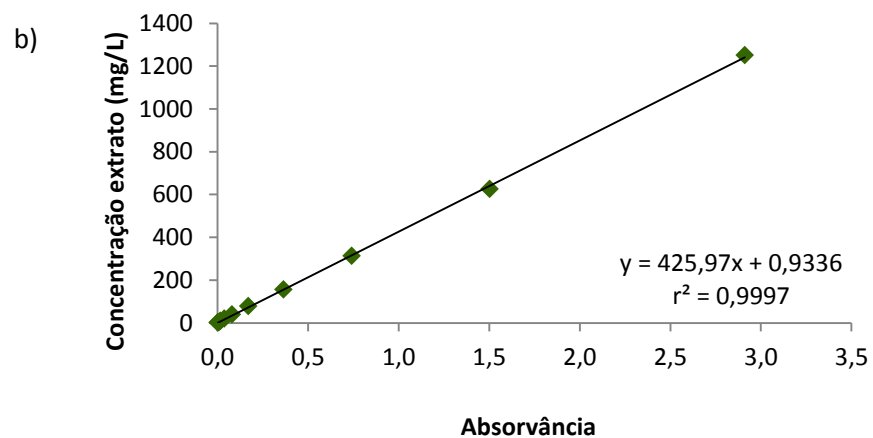
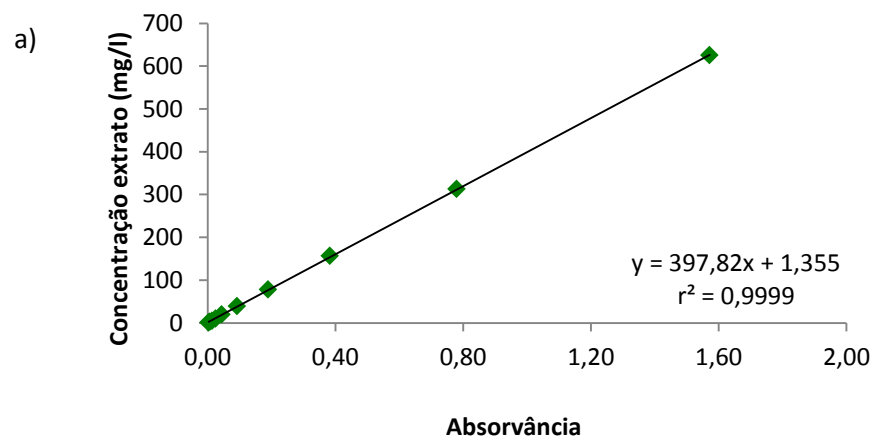


Figura 8 - Retas de calibração de extrato secundário de *O. crocata* em DMSO diluído em a) água ultra pura e b) ASTM, no intervalo de concentrações a) 1,221 – 625 mg/l e b) 1,221 e 1250 mg/l.

Tabela 12 - Valores médios dos parâmetros físico-químicos (concentração de oxigénio dissolvido, temperatura, pH e condutividade) medidos durante o ensaio de toxicidade aguda do extrato secundário de *Oenanthе crocata* em etanol para *Daphnia magna*, no intervalo de concentrações entre 0,018 e 0,284 mg/l. CTR+: solução controlo com ASTM; SOLV: solução controlo com solvente (etanol) a 0,1 ml/l.

Concentração extrato (mg/l)		Oxigénio dissolvido (mg/ml)		Temperatura (°C)		pH		Condutividade (µS/cm)	
		0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h
CTR+	Média	7,68	7,70	19,7	20,5	7,69	8,14	556	563
	Desvio padrão	0,206	0,050	0,10	0,10	0,010	0,010	0,0	1,4
SOLV	Média	7,69	7,76	19,6	20,5	7,71	8,09	555	563
	Desvio padrão	0,085	0,026	0,08	0,08	0,006	0,005	0,8	2,0
0,284	Média	7,52	7,61	19,5	20,2	7,67	7,94	554	563
	Desvio padrão	0,107	0,081	0,05	0,10	0,006	0,005	0,0	0,6
0,142	Média	7,82	7,74	19,5	20,1	7,68	7,97	555	563
	Desvio padrão	0,199	0,088	0,08	0,08	0,000	0,005	0,5	0,5
0,071	Média	7,81	7,63	19,3	20,2	7,69	7,99	556	564
	Desvio padrão	0,067	0,114	0,05	0,08	0,000	0,008	0,8	1,0
0,036	Média	7,84	7,70	19,4	20,3	7,70	8,01	556	564
	Desvio padrão	0,086	0,083	0,00	0,08	0,005	0,008	0,0	1,0
0,018	Média	7,69	7,70	19,5	20,4	7,70	8,07	559	565
	Desvio padrão	0,049	0,031	0,08	0,13	0,005	0,013	0,6	1,4

Tabela 13 - Valores médios dos parâmetros físico-químicos (concentração de oxigénio dissolvido, temperatura, pH e condutividade) medidos durante o ensaio de toxicidade aguda do extrato secundário de *Oenanthhe crocata* em etanol para *Daphnia magna*, no intervalo de concentrações entre 0,284 e 4,522 mg/l. CTR+: solução controlo com ASTM; SOLV: solução controlo com solvente (etanol) a 1,6 ml/l.

Concentração extrato (mg/l)		Oxigénio dissolvido (mg/l)		Temperatura (°C)		pH		Condutividade (µS/cm)	
		0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h
CTR+	Média	8,56	8,40	20,7	20,7	7,94	8,18	546	570
	Desvio padrão	0,328	0,154	0,05	0,00	0,008	0,052	0,6	12,4
SOLV	Média	8,73	8,48	20,7	20,7	7,91	8,17	542	553
	Desvio padrão	0,094	0,252	0,00	0,00	0,008	0,006	1,0	3,7
4,544	Média	8,36	8,70	20,9	20,7	7,77	8,12	542	552
	Desvio padrão	0,218	0,150	0,06	0,06	0,006	0,022	1,0	1,0
2,272	Média	8,54	8,49	20,8	20,7	7,79	8,11	542	550
	Desvio padrão	0,056	0,203	0,10	0,05	0,005	0,005	1,0	1,0
1,136	Média	8,68	8,17	20,9	20,7	7,83	8,06	542	550
	Desvio padrão	0,204	0,194	0,06	0,05	0,005	0,010	0,5	1,3
0,568	Média	8,70	8,55	20,8	20,6	7,85	8,04	543	549
	Desvio padrão	0,119	0,284	0,05	0,05	0,008	0,013	0,5	1,3
0,284	Média	8,85	8,71	20,9	20,6	7,89	8,05	542	550
	Desvio padrão	0,124	0,291	0,05	0,00	0,000	0,006	1,7	1,3

Tabela 14 - Percentagens de mortalidade de *Daphnia magna* exposta a extrato secundário de *Oenanthhe crocata* preparado em etanol, durante 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas. CTR+: solução controlo com ASTM; SOLV: solução controlo com solvente (etanol) a 0,1 ml/l.

Concentração extrato (mg/l)	% Mortalidade				Nº total organismos
	24 h	48 h	72 h	96 h	
CTR+	0	0	0	0	20
SOLV	0	0	0	0	20
0,284	0	0	0	0	20
0,142	0	0	0	0	20
0,071	0	0	0	0	20
0,036	0	0	0	0	20
0,018	0	0	0	0	20

Tabela 15 - Valores de absorvância média a 312 nm ($A_{\text{média}}$) e respetivo desvio padrão das amostras de solução teste mais concentrada (0,284 mg/l) e menos concentrada (0,018 mg/l), obtidas no decorrer do ensaio de toxicidade aguda. É também apresentada a percentagem de variação da absorvância média em relação ao seu valor no tempo inicial (% Variação).

Tempo (h)	0	24	48	72	96
0,284 mg/l					
$A_{\text{média}}$	0,0064	0,0008	-0,0040	-0,0020	0,0024
Desvio padrão	0,0054	0,0036	0,0018	0,0032	0,0074
% Variação	-	-87,5	-162,5	-131,3	-62,5
0,018 mg/l					
$A_{\text{média}}$	0,0025	0,0003	-0,0021	-0,0038	0,0012
Desvio padrão	0,0012	0,0038	0,0007	0,0004	0,0093
% Variação	-	-87,9	-182,8	-255,6	-51,5

Tabela 16 - Percentagens de mortalidade de *Daphnia magna* exposta a extrato secundário de *Oenanthhe crocata* preparado em etanol, durante 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas. CTR+: solução controlo com ASTM; SOLV: solução controlo com solvente (etanol) a 1,6 ml/l.

Concentração extrato (mg/l)	% Mortalidade				Nº total organismos
	24 h	48 h	72 h	96 h	
CTR+	0	0	0	0	20
SOLV	0	0	0	0	20
4,544	0	0	5	5	20
2,272	0	0	5	5	20
1,136	0	0	0	0	20
0,568	0	0	0	0	20
0,284	0	0	0	0	20

Tabela 17 - Valores de absorvância média a 312 nm ($A_{\text{média}}$) e respetivo desvio padrão das amostras de solução teste mais concentrada (4,544 mg/l) e menos concentrada (0,284 mg/l), obtidas no decorrer do ensaio de toxicidade aguda com extrato secundário em etanol. É também apresentada a percentagem de variação da absorvância média em relação ao seu valor no tempo inicial (% Variação).

Tempo (h)	0	24	48	72	96
4,544 mg/l					
$A_{\text{média}}$	0,0049	0,0039	0,0047	0,0053	0,0038
Desvio padrão	0,0015	0,0008	0,0011	0,0014	0,0008
% Variação	-	-25,0	-6,4	-9,6	-29,5
0,284 mg/l					
$A_{\text{média}}$	0,0017	0,0005	-0,0004	0,0029	-0,0007
Desvio padrão	0,0008	0,003	0,001	0,0003	0,0007
% Variação	-	-67,6	-125,0	69,1	-144,1

A OCDE (2004) recomenda que as soluções teste utilizadas durante os ensaios toxicológicos possuam uma concentração de oxigénio dissolvido superior a 3 mg/l, uma temperatura entre 18 e 22 °C, com uma variação máxima de ± 1 °C e um pH entre 6 e 9, com uma variação máxima de 1,6. Neste ensaio, a concentração de oxigénio variou entre 7,42 e 7,89 mg/l, a temperatura entre 19,3 e 20,6 °C e o pH entre 7,67 e 8,15 pelo que os requisitos definidos pela OCDE (2004) foram cumpridos. A imobilidade dos organismos modelo foi averiguada para todas as concentrações teste do intervalo entre 0,284 e 0,018 mg/l e soluções controlo, não se tendo observado efeito em nenhum dos tratamentos ao longo do ensaio (Tabela 3). Efetuou-se ainda um registo dos valores de absorvância das diversas soluções teste, estando apresentados na Tabela 4 os valores médios relativos à concentração mais elevada (0,284 mg/l) e à mais reduzida (0,018 mg/l). A elevada percentagem de variação dos resultados não deve ser valorizada, uma vez que as soluções testadas têm concentrações muito reduzidas de extrato e pouco poder de absorção de radiação eletromagnética a uma escala detetável pelo espectrofotómetro. O intervalo de concentrações utilizado foi definido com base no protocolo nº202 da OCDE (2004) que recomenda que não se ultrapasse a concentração de solvente de 0,1 ml/l nas soluções teste. Contudo, a ausência de mortalidade de *D. magna* e a impossibilidade de leitura rigorosa da absorvância a 312 nm, justificou a utilização de soluções teste com uma concentração de extrato secundário em etanol mais elevada e ultrapassando a concentração de solvente recomendada pela OCDE.

No ensaio de toxicidade aguda para *D. magna* efetuado com o extrato secundário em etanol, entre as concentrações 0,284 e 4,544 mg/l, foram confirmados os requisitos relativos aos parâmetros físico-químicos (Tabela 2). A concentração de oxigénio dissolvido apresentou um valor mínimo de 8,00 mg/l e um valor máximo de 8,98 mg/l, a temperatura variou entre 20,6 e 20,9 °C e o pH registou valores entre 7,76 e 8,22, verificando-se, assim, o cumprimento das normas da OCDE (2004). Quanto à resposta de *D. magna* às soluções teste, constatou-se imobilização dos organismos às duas concentrações mais elevadas, 4,544 e 2,272 mg/l. Estes resultados traduzem-se numa percentagem de mortalidade de 5% às 72 horas e 96 horas para ambos os tratamentos (Tabela 5). Em nenhuma das soluções controlo houve imobilização dos organismos modelo. O fato de as soluções controlo com solvente (etanol) apresentarem uma percentagem de mortalidade nula é indicativo da não interferência do solvente nos resultados de toxicidade obtidos. A imobilização de *D. magna* observada neste ensaio indica uma provável suscetibilidade em relação ao extrato de *O. crocata* em estudo. Na Tabela 6, são apresentados os valores médios da absorvância a 312 nm das soluções teste com concentração mais elevada (4,544 mg/l) e mais reduzida (0,284 mg/l), no início e final do ensaio toxicológico. Verificou-se uma diminuição das percentagens de variação dos valores de absorvância, principalmente às concentrações mais elevadas. Contudo, a maioria das concentrações testadas é próxima do limite de deteção do espectrofotómetro e por isso as medições são pouco rigorosas. Apenas a solução de 4,544 mg/l está incluída no intervalo para o qual a reta de calibração determinada na secção 3.3 é válida, sendo a sua concentração experimental no início do ensaio 4,541 mg/l, variando entre 4,098 e 4,703 mg/l. Estes valores correspondem a uma variação de concentração inferior a $\pm 20\%$ da concentração nominal (4,544 mg/l) pelo que esta se pode considerar constante ao longo do ensaio, de acordo com a OCDE (2004).

Os baixos valores de absorvância que impossibilitaram a determinação das concentrações experimentais do bioensaio e as baixas percentagens de mortalidade de *D. magna*, juntamente com a baixa concentração do extrato secundário de *O. crocata* em etanol, justificaram a substituição deste extrato secundário por outro mais adequado ao estudo presente. Foi selecionado o extrato secundário em DMSO, por se tratar de um extrato com uma concentração (16,60 mg/l) muito superior à do extrato em etanol (2,84 g/l), conforme já discutido na secção 3.1.

3.5. Ensaio de degradação de extrato secundário de *Oenanthe crocata* em DMSO

O ensaio de degradação do extrato secundário de *O. crocata* em DMSO foi realizado com o objetivo de verificar se ocorriam alterações significativas nos valores de absorvância ao pico de absorção da OETX, devido a alteração dos seus compostos ou interações dos mesmos com o meio, durante o período de tempo de um bioensaio de toxicidade, 96 horas. Por decorrer na ausência dos organismos teste, este ensaio permite também verificar a possível interferência de produtos do metabolismo de *D. magna* nas leituras espectralométricas. As soluções de extrato diluído em água ultra pura e em ASTM foram preparadas à concentração de 0,20 g/l, tendo sido selecionada esta concentração por estar incluída no intervalo de concentrações para as quais as retas de calibração determinadas na secção 3.3 são válidas (Figura 8) e por permitir uma boa leitura dos valores de absorvância.

A Tabela 8 apresenta os resultados relativos à absorvância a 312 nm do extrato secundário de *O. crocata* preparado com DMSO e diluído em água e ASTM, às condições do ensaio de toxicidade com *D. magna*. As concentrações experimentais iniciais médias, calculadas de acordo com as equações das retas de calibração da Figura 8, foram 0,21 g/l para a diluição em água e 0,22 g/l para a diluição em ASTM. As concentrações experimentais do extrato secundário diluído em água e ASTM variaram entre 0,19 e 0,22 g/l, e entre 0,21 e 0,22 g/l, respetivamente, nunca ultrapassando uma variação superior a $\pm 20\%$ da concentração nominal (0,20 g/l).

A análise de variância (ANOVA; $P < 0,05$) aplicada aos resultados obtidos não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os valores de absorvância obtidos, ao longo do tempo, em cada tipo de solução de extrato, diluição em água ultra pura ($F_{7,40}=1,117$) e diluição em ASTM ($F_{7,40}=2,227$). A variação não estatisticamente significativa dos valores de absorvância a 312 nm indica que a concentração de extrato também se mantém aproximadamente igual. Convém ressaltar que a substância teste é constituída pelos diversos compostos obtidos pela extração metanólica de raízes secas de *O. crocata*. Como tal, não é possível garantir que a concentração de OETX, ou qualquer outro composto, nas soluções teste se mantenha sem alterações estatisticamente significativas ao longo do tempo do ensaio, já que existem

vários constituintes, além da OETX, que absorvem radiação a 312 nm, como é o caso dos seus derivados *oenanthetol* e a *onenathetone* (Anet et al., 1953).

Para averiguar a interferência dos constituintes do meio do ensaio de toxicidade de *D. magna*, compararam-se os valores de absorvância obtidos para o extrato diluído em água ultra pura e para o extrato diluído em ASTM, às várias horas do ensaio, através de ANOVA ($P < 0,05$). Os valores de do teste F de Snédecor (F) são apresentados na Tabela 8. Não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre as absorvâncias para o extrato diluído em água e para o extrato diluído em ASTM, ao longo do ensaio. Assim, assumimos que a interferência do meio de cultura ASTM na leitura dos valores de absorvância do extrato secundário é desprezível.

A análise de variância da concentração das soluções ao longo do tempo e a manutenção das concentrações de extrato de cada uma das soluções dentro do limite de $\pm 20\%$ de concentração inicial nominal, são um forte indicador de que a concentração de extrato durante os bioensaios toxicológicos com extrato secundário de *O. crocata* em DMSO *D. magna* se manterá aproximadamente igual. De qualquer modo, é indispensável efetuar sempre a leitura dos valores de absorvância ao comprimento de onda de estudo das soluções teste de todos os bioensaios toxicológicos.

3.6. Avaliação da toxicidade aguda do extrato de *Oenanthe crocata* com DMSO para *Daphnia magna*

Os bioensaios de toxicidade aguda em *D. magna* foram realizados de acordo com as normas do protocolo nº202 da OCDE de 2004, com a principal finalidade de determinar o valor de CL_{50} . Neste bioensaio, utilizou-se o extrato secundário de *O. crocata* preparado em DMSO (166,00 g/l) para preparar as soluções teste. Este extrato por possuir uma concentração mais elevada do que o extrato previamente testado (em etanol), permitiu avaliar a toxicidade de extrato a concentrações mais de 3,5 vezes superiores às dos ensaios anteriores (4,54 mg/l), respeitando a concentração máxima de solvente nas soluções teste recomendada pela OCDE, 0,1 ml/l.

Durante os ensaio agudos, foram medidos vários parâmetros físico-químicos – oxigénio dissolvido, pH, temperatura e condutividade – de modo a validar os

Tabela 18 – Valores de absorvância média a 312 nm ($A_{\text{média}}$) e respectivo desvio padrão das amostras de extrato secundário de *O. crocata* preparado com DMSO às condições do ensaio de toxicidade com *D. magna*, a 0,20 g/l. São ainda apresentadas, para cada intervalo de tempo, as percentagens de variação das absorvâncias médias em relação ao tempo inicial (% Variação (0 horas)) e em relação ao intervalo de tempo anterior (% Variação entre intervalos consecutivos). São também apresentados os valores do teste F de Snédecor (F) relativos à análise de variâncias (ANOVA) entre os valores de absorvância do extrato diluído em água e do extrato diluído em ASTM, para cada período de tempo.

Tempo (h)	0	4	8	12	24	48	72	96
Água UP								
$A_{\text{média}}$	0,5129	0,5006	0,4928	0,4919	0,4859	0,5120	0,5376	0,5388
Desvio padrão	0,0270	0,0208	0,0225	0,0298	0,0286	0,0697	0,0736	0,0638
% Variação (0 horas)	-	-2,40%	-3,92%	-4,09%	-5,26%	-0,18%	4,82%	5,05%
% Variação (entre intervalos consecutivos)	-	-2,40%	-1,56%	-0,18%	-1,22%	5,37%	5,00%	0,22%
ASTM								
$A_{\text{média}}$	0,5075	0,4929	0,4834	0,4838	0,4820	0,5248	0,4984	0,4856
Desvio padrão	0,0241	0,0225	0,0119	0,0360	0,0303	0,0185	0,0254	0,0204
% Variação (0 horas)	-	-2,88%	-4,75%	-4,67%	-5,02%	3,41%	-1,79%	-4,32%
% Variação (entre intervalos consecutivos)	-	-2,88%	-1,93%	0,08%	-0,37%	8,88%	-2,64%	-2,57%
$F_{1,10}$	0,129	0,510	0,187	1,519	3,790	0,384	0,814	0,177

Tabela 19 – Valores médios dos parâmetros físico-químicos (concentração de oxigénio dissolvido, temperatura, pH e condutividade) medidos durante o ensaio de toxicidade aguda do extrato secundário de *Oenanthe crocata* em DMSO para *Daphnia magna*. CTR+: solução controlo com ASTM; SOLV: solução controlo com solvente (DMSO) a 0,1 ml/l.

Concentração extrato (mg/l)		Oxigénio dissolvido (mg/ml)		Temperatura (°C)		pH		Condutividade (µS/cm)	
		0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h
CTR+	Média	8,55	8,03	19,7	20,5	8,63	8,27	549	556
	Desvio padrão	0,12	0,07	0,1	0,0	0,02	0,01	1	1
SOLV	Média	8,91	8,66	19,7	20,5	8,59	8,27	554	555
	Desvio padrão	0,02	0,10	0,0	0,1	0,01	0,01	1	0
16,6	Média	8,61	8,19	19,8	20,6	8,58	8,00	549	554
	Desvio padrão	0,07	0,04	0,0	0,0	0,01	0,01	1	0
8,3	Média	8,69	9,00	19,8	20,6	8,58	8,12	548	554
	Desvio padrão	0,14	0,10	0,0	0,0	0,00	0,02	1	0
4,2	Média	8,89	8,45	19,8	20,6	8,59	8,23	548	554
	Desvio padrão	0,12	0,06	0,0	0,0	0,01	0,01	1	1
2,1	Média	9,03	9,14	19,8	20,6	8,60	8,25	548	554
	Desvio padrão	0,03	0,12	0,1	0,0	0,00	0,01	0	1
1,0	Média	8,91	8,86	19,8	20,6	8,58	8,28	548	554
	Desvio padrão	0,01	0,08	0,1	0,0	0,01	0,01	1	1

Tabela 20 - Valores de absorvância média a 312 nm ($A_{\text{média}}(312 \text{ nm})$) e respectivo desvio padrão das amostras de soluções teste, obtidas no decorrer do ensaio de toxicidade aguda. É apresentada também a concentração experimental de extrato de *Oenanthhe crocata* e a suas percentagens de variação em relação às 0 horas (% Variação (0 horas)). Para cada concentração é apresentado valor do teste F de Snédecor (F).

Tempo (h)	0	24	48	72	96
16,60 mg/l					
(F _{4,10} =3,101)					
$A_{\text{média}} (312 \text{ nm})$	0,0375	0,0378	0,0421	0,0359	0,0382
Desvio padrão	0,0019	0,0022	0,0010	0,0032	0,0024
Concentração (mg/l)	16,91	17,04	18,87	16,23	17,21
% Variação (0 horas)	-	0,76%	11,59%	-4,03%	1,76%
8,30 mg/l					
(F _{4,10} =3,150)					
$A_{\text{média}} (312 \text{ nm})$	0,0166	0,0164	0,0184	0,0145	0,0155
Desvio padrão	0,0032	0,0005	0,0005	0,0029	0,0010
Concentração (mg/l)	8,00	7,92	8,77	7,11	7,54
% Variação (0 horas)	-	-1,06%	9,58%	-11,18%	-5,85%
4,15 mg/l					
(F _{4,10} =0,861)					
$A_{\text{média}} (312 \text{ nm})$	0,0072	0,0054	0,0090	0,0073	0,0076
Desvio padrão	0,0019	0,0047	0,0006	0,0013	0,0011
Concentração (mg/l)	4,00	3,23	4,77	4,04	4,17
% Variação (0 horas)	-	-19,17%	19,17%	1,06%	4,26%
2,08 mg/l					
(F _{4,10} =1,952)					
$A_{\text{média}} (312 \text{ nm})$	0,0027	0,0031	0,0036	0,0018	0,0035
Desvio padrão	0,0008	0,0009	0,0013	0,0009	0,0008
Concentração (mg/l)	2,0837	2,2541	2,4671	1,7003	2,4245
% Variação (0 horas)	-	8,18%	18,40%	-18,40%	16,35%

Tabela 21 – Percentagens de mortalidade de *Daphnia magna* exposta a extrato secundário de *Oenanthhe crocata* preparado em DMSO, durante 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas. CTR+: solução controlo com ASTM; SOLV: solução controlo com solvente (DMSO) a 0,1 ml/l.

Concentração extrato (mg/l)	% Mortalidade			
	24 h	48 h	72 h	96 h
CTR+	0	0	0	0
SOLV	0	0	0	0
16,6	40	100	100	100
8,3	20	67	80	93
4,2	0	0	7	7
2,1	0	0	0	0
1,0	0	0	0	0

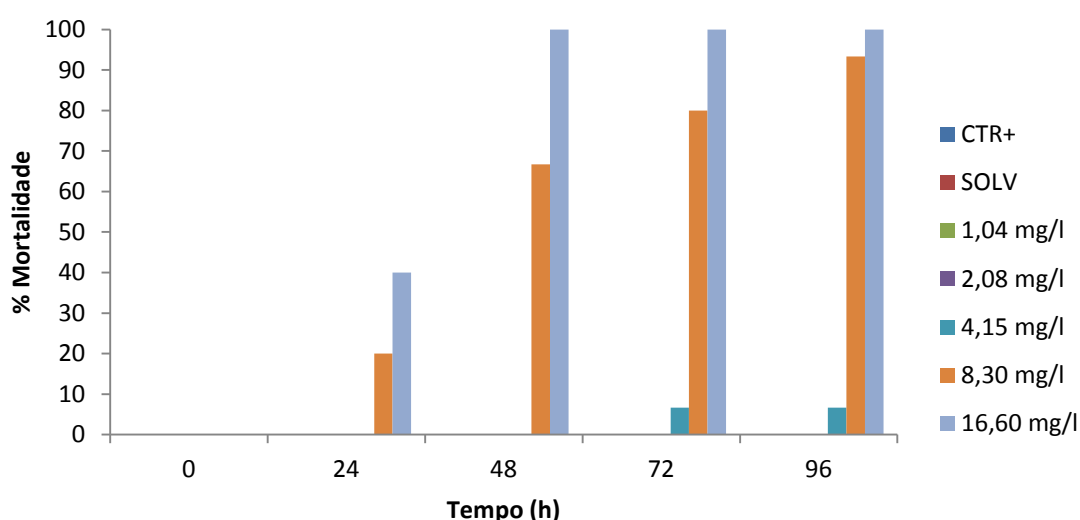


Figura 9 – Mortalidade em percentagem (%) de *Daphnia magna* durante o ensaio de toxicidade aguda com extrato secundário de *Oenanthhe crocata* preparado em DMSO. CTR+: controlo com ASTM; SOLV: controlo com solvente (DMSO).

testes efetuados (Tabela 9). A concentração de oxigénio dissolvido variou entre 7,99 e 9,22 mg/l, a temperatura variou entre 19,7 e 20,6 °C e o pH entre 8,01 e 8,65, tendo-se verificado para todas as soluções as condições recomendadas pela OCDE (2004), referidas na secção 3.4.

As concentrações das soluções teste foram analisadas por espectrofotometria a 312 nm, sendo os valores de absorvância média para os diversos intervalos de tempo, apresentadas na Tabela 2, à exceção dos relativos à solução com 1,04 mg/l que é abrangida pelo intervalo de validade da reta de calibração previamente determinada (Figura 8). A análise de variância (ANOVA; $P < 0,05$) não identificou diferenças estatisticamente significativas entre os valores de absorvância obtidos ao longo do tempo para as diversas

concentrações. Calculou-se ainda a concentração experimental das soluções teste e a sua percentagem de variação em relação ao tempo inicial (0 horas). Nenhuma das soluções apresentou variações superiores a 20%, pelo que a concentração das soluções teste é aproximadamente a mesma ao longo do tempo.

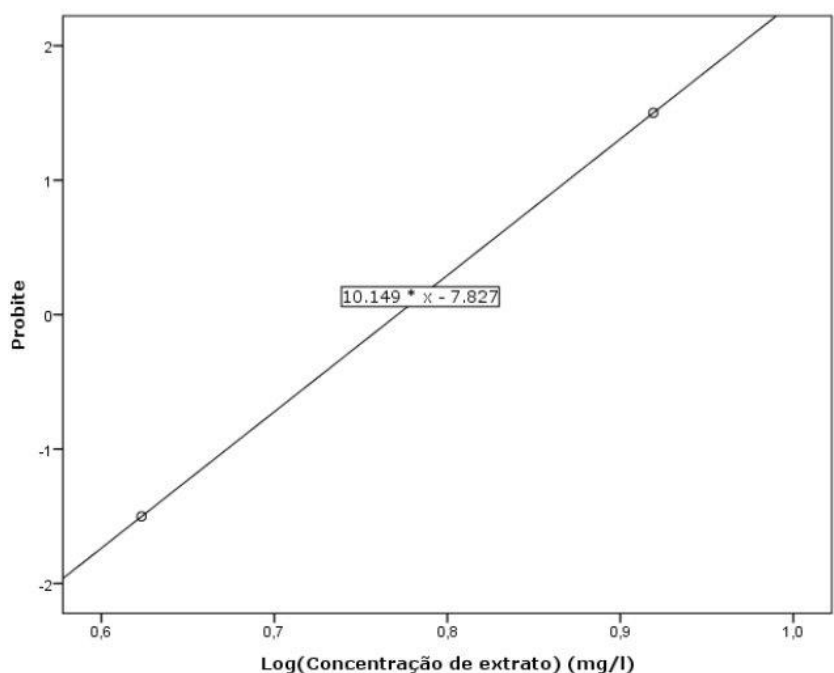


Figura 10 – Gráfico de probite versus logaritmo da concentração de extrato secundário de *Oenanthe crocata* preparado em DMSO (log(Concentração de extrato)) e respetiva equação, relativos às 96 horas de ensaio toxicológico com *Daphnia magna*.

Tabela 22 – Concentração letal a 10% (CL₁₀), concentração letal a 20% (CL₂₀) e concentração letal mediana (CL₅₀), e respetivos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) determinadas para o extrato secundário de *O. crocata* em DMSO.

	CL _x (96h)	IC (95%)	
CL ₁₀	4,403	3,177	5,207
CL ₂₀	4,871	3,747	5,705
CL ₅₀	5,909	4,949	7,053

Relativamente à resposta de *D. magna* ao ensaio toxicológico de extrato secundário de *O. crocata* em DMSO, constatou-se imobilização dos organismos às duas concentrações 16,6 e 8,3 a partir das 24 horas e a 4,2 mg/l a partir das 72 horas de duração do ensaio (Tabela 10). Às 96 horas a concentração mais elevada, 16,6 mg/l, apresentou 100% de mortalidade, enquanto para as soluções controlo a mortalidade foi nula ao longo de todo o ensaio, estando de acordo com as normas definidas pela OCDE (Figura 9). A partir dos resultados obtidos neste ensaio, efetuou-se uma análise probite (Figura 10) para

determinação dos valores de CL_{10} , CL_{20} e CL_{50} às 96 horas de ensaio, obtendo os valores apresentados na Tabela 11.

4. Conclusões

O dimetilsulfóxido (DMSO) revelou ser um bom solvente para os compostos obtidos por extração metanólica das raízes de *Oenanthe crocata*, por permitir a produção de extratos secundários de elevada concentração e ser adequado à aplicação em bioensaios com *Daphnia magna*. A concentração de extrato nas soluções teste ao longo de 96 horas não sofreu variações significativas.

O extrato metanólico de raízes de *Oenanthe crocata* demonstrou ser prejudicial à sobrevivência de *Daphnia magna*, sendo efetivo mesmo a concentrações reduzidas (2,272 mg/l) e apresentando um valor de CL₅₀(96h) de 5,909 mg/l. Assim, esta investigação constitui uma evidência científica da possibilidade de interferência dos compostos de *Oenanthe crocata* nos organismos de ecossistemas dulçaquícolas, se incorporados neste meio.

Seria interessante realizar um ensaio de toxicidade crónica com o extrato de *Oenanthe crocata* por forma a averiguar os seus efeitos subletais e na reprodução de *Daphnia magna*.

Referências Bibliográficas

- American Society for Testing and Materials (ASTM). 1980. *Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians, Report E-729-80*. Filadélfia: ASTM
- Anet, E.F.L.J.; Lythgoe, B.; Silk, M. H.; Trippett, S. 1953. Oenanthotoxin and cicutoxin. Isolation and structures. *J Chem Soc*, 62, p.309.
- Appendino, G. & Pollastro, F. 2009. Polyacetylenes from sardinian *Oenanthe fistulosa*: a molecular clue to risus sardonius. *J Nat Pro*, 72, pp.962–965.
- Baird, D.J.; Soares, A.; Girling, A.; Barber, I.; Bradley, M.; Calow, P. 1989. *The Long-Term Maintenance of Daphnia magna Straus for Use in Ecotoxicity Tests: Problems and Prospects*. In H. Lokke, H. Tyle, & F. Bro-Rasmussen, eds. *Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology*. Lyngby, pp. 114–148.
- Ball, M.J.; Flather, M.L.; Forfar, J.C. 1987. Hemlock water dropwort poisoning. *Postgrad Med J*, 63, pp.363–5..
- Barbosa, I.R.; Martins, R.; Sá e Melo, M; Soares, A. M. V. M. 2003. Acute and chronic toxicity of dimethylsulfoxide to *Daphnia magna*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 70, pp.1264–8.
- Bees Wasps & Ants Recording Society, 1998. *Colletes floralis* (Eversmann,1852). Available at: <http://www.bwars.com/index.php?q=bee/colletidae/colletes-floralis> [Accessed June 17, 2014].
- Bell, C.E. 2004. Poisonous plants in the *Apiaceae*. In *Proceedings of the California Weed Science Society*. California Weed Science Society, pp. 111 – 113.
- Biological Records Centre, 2008. Database of Insects and their Food Plants. Available at: <http://www.brc.ac.uk/dbif/homepage.aspx> [Accessed June 17, 2014].
- Boardman, P.; Cornish, R; Pickes, A.; Turpin, S. 2013. *Preston Montford Wildlife Review*. Available at: <http://www.field-studies-council.org/> [Accessed June 17, 2014].
- Bohlmann, F.; Rode, R. 1968. Polyacetylenverbindungen, 150. Notiz über die Polyine aus *Pittosporum buchanani* Hook. fil. *Chem Ber*, 101, p 1889
- Campos, M.G.; Proença da Cunha, A. 2001. *Efeitos Tóxicos no Homem e em Animais Domésticos Provocados por Plantas Espontâneas em Portugal*, Lisboa: Publicações Farmácia Portuguesa, Associação Nacional das Farmácias.
- Castroviejo, S. 2003. *Flora Iberica - Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares* G. N. Feliner, S. L. Jury, & A. Herrero, eds., Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC, Volume X, pp 220-223.
- Centre for Aquatic Plant Management 2005. Information Sheet: 31 Hemlock Water Dropwort (*Oenanthe crocata*).

- Christensen, L.P.; Brandt, K., 2006. Bioactive polyacetylenes in food plants of the *Apiaceae* family: occurrence, bioactivity and analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 41, pp.683–93.
- Cortes, A.J.C.E. 2010. Mortes súbitas numa vacada - *Oenanthe crocata*. *Clínica Veterinária de Santo Onófre*. Available at: <http://www.clinicavetstoonofre.com/news/mortes-subitas-numa-vacada/> [Accessed February 1, 2014].
- Dewick, P. 2009. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, Chichester: John Wiley & Sons.
- Durand, M.-F.; Pommier, P.; Chazalatte, A.; de Haro, L., 2008. Child poisoning after ingestion of a wild *Apiaceae*: a case report. *Arch Pediatr* 15, pp.139–41.
- Ebert, D. 2005. Ecology, epidemiology and evolution of parasitism in *Daphnia*. *Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/> [Accessed February 15, 2014].
- Fernandes, J. 2013. Capeia Arraiana. *A pesca nos rios do interior*. Available at: <http://capeiaarraiana.pt/2013/07/31/a-pesca-nos-rios-do-interior/> [Accessed February 1, 2014].
- Ferreira, P.M.P.; Carvalho, A.; Farias, D.; Cariolano, N.; Melo, V.; Queiroz, M; Martins, A.; Machado-Neto, J. 2009. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81, pp.207–16.
- Finney, D.J., 1971. *Probit Analysis*, 3ª edição, Cambridge: Cambridge University Press.
- Gaillard, Y.; Pepin, G. 1999. Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxins by high-performance liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry. *Journal of chromatogr*, 733, pp.181–229.
- Golan, D.; Tashjian, A.; Armstong, E.; Armstrong, A. 2012. *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*, 3ª edição, Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins USA, pp164-185.
- Grundy, H.F.; Howarth, F. 1956. Pharmacological studies on hemlock water dropwort. *Br J Pharmacol*, 11, pp.225–30.
- Guilhermino, L.; Diamantino, T; Silva, M.; Soares, A. M. V. M. 2000. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicol Environ Saf*, 46, pp.357–62.
- Hill, B.E.; Lythgoe, B.; Mirvish, S.; Trippett, S. 1953. Oenanthotoxin and Cicutoxin. Part II. The Synthesis of (±)-Cicutoxin and of Oenanthetol. *J Chem Soc*, 309, pp.1770–5.
- Intergovernmental Panel on Climate Change, 2013. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*.

- Jungmann, D.; Benndorf, J., 1994. Toxicity to *Daphnia* of a compound extracted from laboratory and natural *Microcystis spp.*, and the role of microcystins. *Freshwat Biol*, 32, pp.13–20.
- Khangarot, B.S.; Ray, P.K., 1988. The confirmation of a mammalian poison classification using a water flea (*Daphnia magna*) screening method. *Arch. Hydrobiol.*, 133, pp.447–455.
- King, L.; Lewis, M.; Parry, D.; Twitchett, P.; Kilner, E. 1985. Identification of Oenanthotoxin and Related Compounds in Hemlock Water Dropwort Poisoning. *Hum Exp Toxicol*, 4, pp.355–364.
- Kite, G.; Stoneham, C.; Veitch, N.; Stein, B.; Whitwell, K. 2006. Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the investigation of poisoning by *Oenanthe crocata*. *J Chromatogr*, 838, pp.63–70.
- Kuklev, D. V; Domb, A.J.; Dembitsky, V.M. 2013. Bioactive acetylenic metabolites. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 20, pp.1145–59.
- Lampert, W. 2006. *Daphnia*: model herbivore, predator and prey. *Pol J Ecol*, 54, pp.607–20.
- Martins, A.; Guimarães, L.; Guilhermino, L. 2013. Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to *Daphnia magna* assessed at two temperatures. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36, pp.1022–32.
- Nobre, A. 1896. A destruição do peixe dos rios pela *Oenanthe crocata* L. In *Annaes de Sciencias Naturaes*. Porto: Coimbra - Imprensa de Universidade, p. 68.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2004. Test No. 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test,
- Parque Biológico de Vinhais, Parque Biológico de Vinhais. Available at: <http://www.parquebiologicodevinhais.com/> [Accessed June 17, 2014].
- Pinho, R.; Fonseca, H.; Silva, H., 2001. Biorede. *Universidade de Aveiro*. Available at: <http://www.biorede.pt/page.asp?id=1919> [Accessed June 12, 2014].
- Pinto, J.S.P., 2013. Efeitos tóxicos do extrato da planta *Oenanthe crocata* na microalga *Chlorella vulgaris*. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Quality Meat Scotland, 2014. NADIS - National Animal Disease Information Service. *Plant Poisoning in Cattle*. Available at: <http://www.nadis.org.uk/bulletins/plant-poisoning-in-cattle.aspx> [Accessed February 1, 2014].
- Rammler, D.H.; Zaffaroni, A. 1967. Biological Implications of DMSO based on a review of its chemical properties. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 141, pp.13–23.
- Saunders, P., 2012. *The bees and Wasps of Marsland Nature Reserve*. Available at: <http://kernowecology.co.uk/marsland.pdf> [Accessed January 31, 2014].

- Schep, L.J.; Slaughter, R.; Becket, G.; Beasley, D. 2009. Poisoning due to water hemlock. *Clin Toxicol*, 47, pp.270–8.
- Stein, J.R. 1973. *Handbook of Physiological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. London: Cambridge, University Press, pp 7-24.
- Valente, J.; Zuzarte, M.; Gonçalves, M.; Lopes, M.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L.; Cruz, M. 2013. Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 62, pp.349–54..
- Wyrembek, P; Lebida, K.; Mercik, K.; Szczuraszek, K.; Szczot, M.; Pollastro, F.; Appendino, G.; Mozrzymas, J. 2010. Block and allosteric modulation of GABAergic currents by oenanthotoxin in rat cultured hippocampal neurons. *Br J Pharmacol*, 160, pp.1302–15.
- Wyrembek, P.; Negri, R.; Appendino, G.; Mozrzymas, J. 2012. Inhibitory effects of oenanthotoxin analogues on GABAergic currents in cultured rat hippocampal neurons depend on the polyacetylenes' polarity. *Eur J Pharmacol*, 683, pp.35–42.
- Zidorn, C.; Jöhrer, K.; Schubert, B.; Sigmund, E.; Mader, J.; Elimerer, E.; Stuppner, H. 2005. Polyacetylenes from the *Apiaceae* vegetables carrot, celery, fennel, parsley, and parsnip and their cytotoxic activities. *J Agric Food Chem*, 53, pp.2518–2523.

Anexos

A.1. Composição química do meio MBL

Tabela I – Composição química, em termos quantitativos e qualitativos, do meio MBL (Stein 1973) para cultura de *Chlorella vulgaris*. Todas as soluções foram preparadas em água ultra pura.

Fórmula química	Concentração das soluções de reserva (g/l)	Volume de solução reserva adicionado por litro de MBL (ml/l)
Macronutrientes		
CaCl ₂ .2H ₂ O	36,76	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	36,97	1
NaHCO ₃	12,60	1
K ₂ HPO ₄	8,71	1
NaNO ₃	85,01	1
NaSiO ₃ .9H ₂ O	28,42	1
Micronutrientes		
Na ₂ EDTA	4,36	1
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15	1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01	1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022	1
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01	1
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,18	1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,006	1
Vitaminas		
B1 (thiamine.HCl)	0,1×10 ⁻³	0,125 (ver preparação de complexo vitamínico)
H (biotina)	0,5×10 ⁻⁶	
B12 (cianocobalamina)	0,5×10 ⁻⁶	
Tampão		
Tris (hidroximetil)-aminometano	250	2

A.1. Preparação de complexo vitamínico

A partir de soluções concentradas das vitaminas B1 (thiamine.HCl, 20 mg/l), H (biotina, 10 mg/l) e B12 (cianocobalina, 10 mg/ml) retiraram-se 2500 µl, 25 µl e 25 µl, respetivamente, para balão volumétrico de 500 ml perfazendo o volume com água ultra pura. Esta solução foi filtrada a vácuo através de filtro 0,22 µm (Millex®-GS, Merck Millipore Ltd.), dividida por microtubos de 2 ml em condições de assepsia e conservada a -20 °C. Este complexo foi posteriormente adicionado aos meios MBL e ASTM.

A.3. Preparação de suplemento orgânico de *Ascophylum nodosum*

O suplemento orgânico foi preparado adicionando 35 mL de solução concentrada de suplemento composto por extrato de *A. Nodosum* (Baird et al. 1989) a água ultra pura, perfazendo um volume de 1000 ml. A absorvância da solução concentrada foi medida a 400 nm, na proporção 1:10, efetuando diluições sucessivas em água ultra pura, até obter um valor de absorvância de 0,620. O suplemento orgânico foi armazenada no escuro, a 4°C.

Este suplemento de *A. nodosum* foi adicionado ao ASTM para manutenção de culturas de *D. magna*.

A.4. Composição química do meio ASTM

Tabela II - Composição química, em termos quantitativos e qualitativos, do meio ASTM (ASTM, 1980) para cultura de *Chlorella vulgaris*. Todas as soluções foram preparadas em água ultra pura. *A solução de CaSO₄.2H₂O foi preparada na altura, não sendo mantida em reserva.

Fórmula química	Concentração das soluções de reserva (g/l)	Quantidade de solução reserva adicionado por litro de ASTM (ml/l)
NaHCO ₃	19,20	10
MgSO ₄ .7H ₂ O	24,57	10
KCl	0,80	10
CaSO ₄ .2H ₂ O	-	0,12 g/l*

As soluções de NaHCO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e KCl foram preparadas em água ultra pura com antecedência e conservadas a 4°C . A solução de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em água ultra pura foi preparada na altura.